

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Dizertační práce



**Posttranslační modifikace adaptorového proteinu DAXX
v buněčné odpovědi na genotoxický stres**

Jan Bražina

Školitel: RNDr. Ladislav Anděra, CSc.

Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

Oddělení buněčné signalizace a apoptózy

Praha, 2016

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracoval samostatně s využitím pouze uvedených a řádně citovaných pramenů a literatury a že práce nebyla využita v rámci jiného vysokoškolského studia či k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, 25.dubna 2016

.....

Jan Bražina

Děkuji svému školiteli Ladislavu Anděrovi za trpělivost při vedení práce, konzultantce Haně Hanzlíkové za cenné diskuze a za držení hlavy nad vodou a svým rodičům z podporu. Dík také patří Liboru Macůrkovi a Janu Švadlenkovi za pomoc s experimenty.

Seznam použitých zkratek:

53BP1	p53 binding protein 1
5-FU	5-fluorouracil
ABCA	ATP-binding cassette transporter
ALAS	delta-aminolevulinate synthase
ALDH4A1	aldehyde dehydrogenase 4 family, member A1
ALT	alternative lengthening of telomeres; alternativní prodlužování telomer
APAF1	apoptotic protease activating factor 1
ASF1	anti-silencing function protein 1
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and RAD3-related
ATRIP	ATR Interacting Protein
ATRX	alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
AXIN	axis inhibition
BAP1	BRCA1 associated protein 1
BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B-cell lymphoma protein 2
BER	base excision repair
BES	N,N-bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethanesulfonic acid
BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
BRCA1	breast cancer 1 protein
BrdU	bromodeoxyuridine
BSA	bovine serum albumin
CBP	CREB-binding protein
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CENP-C	centromere protein C
cIAP1 / cIAP2	inhibitor of apoptosis protein 1 / 2
CK	casein kinase
COP1	E3 ubiquitin-protein ligase COP1
Cre	Cre recombinase
CSA	Cockayne Syndrome A
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole

DAXX	death-associated protein 6
DDR	DNA damage response, odpověď na poškození DNA
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNMT1	DNA methyltransferase 1
DOX	doxycyklin
DSB	double-strand breaks; dvojřetězcové zlomy v DNA
dsDNA	double-strand DNA; dvojřetězcová DNA
DTT	dithiothreitol
DUB	deubiquitinating enzymes; enzymy odstraňující z proteinů ubikvitinylový zbytek
ECL	enhanced chemiluminiscence
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ER1	estrogen receptor 1
ESC	embryonic stem cells, embryonální kmenové buňky
FANC	Fanconi anemia
FDXR	ferredoxin reductase
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible protein alfa
GAM	goat anti-mouse
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GAR	goat anti-rabbit
GPX1	glutathione peroxidase
GSK3b	glycogen synthase kinase 3 beta
HAUSP (USP7)	herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease (Ubiquitin specific processing protease 7)
HBD	histon-binding domain
HDAC	histone deacetylase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIPK	homeodomain-interacting protein kinase
HIRA	HIR histone cell cycle regulation defective homolog A
HMBS	hydroxymethylbilane synthase
HP1	heterochromatin protein 1
HPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
HR	homologní rekombinace

HRP	horse reddish peroxidase
HU	hydroxyurea
ChIP-Seq	chromatinová imunoprecipitace s následnou sekvenací
CHK1	checkpoint kinase 1
CHK2	checkpoint kinase 2
CHX	cykloheximid
IKBA	NF-kappa-B inhibitor alpha
IL1a	inteleukin 1a
IL-6	inteleukin 6
IP	imunoprecipitace
IR	ionizační záření
K/D	knock-down; potlačení genové exprese
K/O	knock-out; genová delece
KAP1	KRAB-associated protein-1
KAT5/Tip60	K(Lysine) Acetyltransferase 5 /
KRAS	Kirsten ras oncogene homolog
LC-MS	liquid chromatography–mass spectrometry
LET	linear energy transfer
LOF/GOF	loss of function / gain of function
LPS	lipopolysacharid
LTR	long terminal repeats
MAR	mouse anti-rabbit
MDC1	mediator of DNA-damage checkpoint 1
MDM2	mouse double-minute 2
MMP3	matrix metalloprotease 3
MMR	mismatch repair
MRN	komplex proteinů MDC1 – Rad51 – NBS1
NAD+	nicotinamide adenine dinucleotide (oxidovaná forma)
NCS	neokarzinostatin
NEC	neuroendocrine cancer
NEDD8	neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8
NER	nucleotide excision repair
NF-κB	nuclear factor kappa-B
NHEJ	non-homologous end-joining

NLS	nuclear localisation signal
NOS	nitric oxid synthase
NP40	nonyl phenoxypolyethoxyethanol
NSC	neuronal stem cells
NT	non targeting
PAGE	polyacrylamid gel electrophoresis
PALB2	protector and locator of BRCA
panNET	pancreatic neuroendocrine tumors
PAR	poly (ADP-ribose)
PARG	poly (ADP-ribose) glycohydrolase
PC3	prostate cancer
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein
PGM	phosphoglucomutase
PIG3; PIG6	p53-inducible gene 3; p53-inducible gene 6
PIRH2	p53-induced RING-H2 protein
PML	promyelocytic leukemia protein
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTM	posttranslační modifikace
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RARRES1	retinoic acid receptor responder protein 1
RER	ribonucleotide excision repair
RNF168	ring finger protein 168
ROS	reactive oxygen species, reaktivní kyslíkové radikály
RPA	replication protein A1
RPII	RNA polymeráza II
RPL37a	ribosomal protein L37a
SCO2	SCO2 cytochrome c oxidase assembly
SDH	succinate dehydrogenase
SDS	sodium dodecyl sulphate
SESN2	sestrin 2
SIAH1	seven in absentia homolog
SILAC	stable isotope labeling by amino acids in cell culture
SMAD4	mothers against decapentaplegic homolog 4 (drosophila)

SP100	speckled 100 KDa nuclear antigen
SSB	single-strand DNA break, jednořetězcový zlom v DNA
ssDNA	single-strand DNA, jednořetězcová DNA
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TALEN	transcription activator-like effector nucleases
TBP	TATA binding protein
TIGAR	<i>TP53</i> -inducible glycolysis and apoptosis regulator
TNF α	tumor necrosis factor alpha
TOPBP1	DNA topoisomerase 2-binding protein 1
TRF1	telomeric repeat-binding factor 1
USP32	ubiquitin specific peptidase 32
VP16	etoposid
WIP1	wild-type p53-induced phosphatase
WST-8	water soluble tetrazolium
WT	wild type
XPB	xeroderma pigmentosum protein B
XPD	xeroderma pigmentosum protein D
XPF	xeroderma pigmentosum protein F
XPG	xeroderma pigmentosum protein G
XRCC4	X-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 4
ZEB2	zinc finger e-box binding homeobox 2

Obsah

1	Shrnutí.....	- 8 -
2	Teoretický úvod	- 9 -
2.1	Buněčná odpověď na poškození DNA.....	- 9 -
2.1.1	Regulační mechanismy v DDR: posttranslační modifikace proteinů.....	- 9 -
2.1.2	Typy poškození DNA a jejich opravy – jednořetězcové zlomy.....	- 10 -
2.1.3	Typy poškození DNA a jejich opravy – dvojitřetězcové zlomy.....	- 12 -
2.1.4	Charakterizace a využití látek a záření poškozujících DNA	- 13 -
2.1.5	Apikální kináza ATM.....	- 15 -
2.1.6	Úloha p53 v DDR.....	- 16 -
2.2	Adaptorový protein DAXX.....	- 19 -
2.3	Popsané funkce DAXX.....	- 22 -
2.3.1	DAXX jako adaptor ubikvitinových ligáz/proteáz.....	- 22 -
2.3.2	DAXX a remodelace chromatinu	- 24 -
2.3.3	DAXX jako chaperon histonů	- 25 -
2.3.4	DAXX jako regulátor transkripce.....	- 27 -
2.3.5	DAXX a antivirová obrana.....	- 29 -
2.4	DAXX v nádorové transformaci	- 32 -
3	Cíle práce	- 34 -
4	Použitý materiál a metodika.....	- 35 -
5	Výsledky	- 43 -
5.1	Analýza vlivu poškození DNA na fosforylaci proteinu DAXX	- 43 -
5.1.1	Identifikace fosforylovaného motivu DAXX.....	- 45 -
5.1.2	Příprava a charakterizace anti-fosfo S564 protilátky	- 46 -
5.1.3	Fosforylace DAXX na S564 je závislá na kináze ATM.....	- 48 -

5.1	Fosforylace DAXX na S564 je negativně regulována fosfatázou WIP1	- 51 -
5.2	Funkce fosforylovaného S564 v proteinu DAXX	- 55 -
5.2.1	Fosforylace S564 a její vliv na stabilitu proteinu DAXX	- 55 -
5.2.2	Fosforylace DAXX a její vliv na stabilitu transkripčního faktoru p53	- 56 -
5.2.3	Vliv proteinu DAXX na aktivitu NF- κ B, SMAD4 a BRCA1	- 64 -
6	Diskuze	- 68 -
7	Závěry.....	- 74 -
8	Použitá literatura	- 75 -

1 Shrnutí

Zachování kontinuity chromozomů a úplné genetické informace v lidských buňkách je rozhodující pro přežití buňky resp. celého organismu a zabraňuje patologickým stavům ohrožujícím život či genetickou kontinuitu. Buněčná DNA je stále vystavována endogennímu i exogennímu stresu poškozujícím její obsah či integritu a aktivujícím mechanismy detekce a opravy těchto poškození (DDR). Jedním z nejzávažnějších druhů poškození DNA jsou tzv. dvojřetězcové zlomy (DSB), kdy dojde u obou vláken k lokálnímu přerušení kovalentní vazby mezi cukrem a fosfátem. DSB spouští vlnu posttranslačních modifikací, které regulují proteinové interakce, jadernou lokalizaci a katalytickou aktivitu až stovek proteinů. Tyto modifikace zahrnují acetylaci, metylaci, SUMOylaci, ubikvitinylaci a zejména pak fosforylaci. Mezi nejvýznamnější kinázy účastnící se DDR jsou kinázy ATM, ATR a DNA-PK, jež jsou aktivovány bezprostředně po detekci poškozeného místa.

DAXX (death-associated protein 6) je adaptorový, převážně jaderný protein, který se v buňkách účastní remodelace chromatinu, modulace genové exprese, protivirové odpovědi a inserce histonové varianty H3.3 do aktivně transkribovaného chromatinu či telomer. Daxx je esenciální pro myší embryogenezi, neboť jeho homozygotní delece je letální v E9.5-10. V roce 2006 byla publikována studie mapující substráty kináz ATM, ATR a DNA-PK. Mezi zhruba sedmi sty proteiny, které byly fosforylovány v rámci DDR, byl identifikován také protein DAXX.

V naší práci jsme studovali vliv DDR na molekulární a funkční modulace adaptoru DAXX. DAXX je fosforylován na serinu 564 po tvorbě DSB indukovaných chemicky (etoposid, neokarzinostatin) i ionizačním zářením. Tato fosforylace je zprostředkována specificky kinázou ATM, zatímco kinázy ATR či DNA-PK se na této fosforylace nepodílí. Klíčovým negativním regulátorem této fosforylace je fosfatáza WIP1. V souladu s novými poznatky o onkogenní funkci WIP1 byla defosforylace S564 nejlépe pozorovatelná v nádorových buněčných liniích, ve kterých byla díky mutaci exprimována stabilnější forma WIP1. Dále jsme ukázali, že jak fosforylace S564 tak i samotný DAXX nemají vliv jak na vlastní stabilitu DAXX, tak i na stabilitu a transkripční aktivitu proteinu p53. Potlačení exprese i genetická delece *DAXX* neměly vliv na expresi transkripčních cílů p53 (*GADD45a*, *NOXA*, *MDM2*, *p21*, *PUMA*, *SESN2*, *TIGAR* a *WIP1*), čímž jsme rozporovali dlouholetý model, dle kterého DAXX (včetně fosforylace S564) hraje klíčovou roli při stabilizaci p53. Naopak jsme identifikovali řadu genů, jejichž exprese je závislá na DAXX a že mechanismus této regulace je pravděpodobně epigenetického charakteru.

2 Teoretický úvod

2.1 Buněčná odpověď na poškození DNA

Buněčná DNA je opakovaně vystavována jak exogenním (např. ionizační záření, ultrafialové záření, chemikálie) tak i endogenním (např. replikační stres, ROS, rekombinace) stresům, které mohou vést k poškození její struktury. Během evoluce se v buňkách vyvinula řada mechanismů, umožňujících adekvátní buněčnou reakci na poškození DNA. Signální kaskáda spuštěná buňkou po poškození DNA se nazývá odpověď na poškození DNA (DNA damage response, DDR). Primární buněčnou reakcí je oprava těchto poškození některým z řady mechanismů, aktivovaných podle typu poškození. Prvním krokem opravných procesů je detekce místa s poškozenou DNA. Následuje modifikace poškozeného místa tak, aby se zabránilo jeho dalšímu rozšíření. Při rozsáhlém poškození DNA je zastaven buněčný cyklus, což je nezbytné jednak pro zabránění přenosu možných mutací a jednak pro získání dostatečného časového okna pro vlastní opravné procesy.

V některých případech je DNA poškozená natolik, že ji není možné efektivně opravit. Pak dochází k eliminaci těchto buněk apoptózou nebo k indukci permanentní zástavy buněčného cyklu (senescence). Selžou-li oba tyto ochranné mechanismy, přenáší si buňka poškozenou DNA do další generace, zvyšuje se počet mutací a genomová nestabilita, což jsou jedny s hlavními příčinami nádorové transformace.

2.1.1 Regulační mechanismy v DDR: posttranslační modifikace proteinů

Posttranslační modifikace proteinů (PTM) hrají v modulaci signálních kaskád nezastupitelnou úlohu a to zejména tím, že ovlivňují aktivitu enzymů, stabilitu proteinů, aktivaci transkripčních faktorů či označují místo dalších PTM.

Fosforylace

Pravděpodobně nejčastější a nejvíce studovanou PTM jsou fosforylace, které také participují v aktivaci signálních kaskád DDR. Mezi nejvýznamnější kinázy v DDR patří apikální kinázy DNA-PK, ATR nebo ATM u nichž je odhadován počet substrátů na několik set až tisíc [1]. Dalšími významnými kinázami jsou např. CHK1 a CHK2 regulujících zástavu buněčného cyklu.

Peptidové posttranslační modifikace (ubikvitinylace a SUMOylace)

Ubikvitin je malý (76 aminokyselin), evolučně velmi konzervovaný protein, který je kovalentně připojen na proteiny procesem nazývaným ubikvitinylace. Před samotným připojením ubikvitinu na cílový protein je nejdříve ubikvitin tzv. aktivován a konjugován s E3 ligázou¹. Specifické E3 ligázy

¹ aktivaci ubikvitinu katalyzuje E1 aktivační enzym a E2 konjugační enzymem pak naváže aktivovanou molekulu ubikvitinu na E3 ligázu

pak katalyzují připojení ubikvitin na aminokyselinu lysin. Na substrát může být připojen buď jedna molekula ubikvitin (monoubikvitinylace) nebo postupně celý řetězec, kdy jsou k sobě jednotlivé molekuly ubikvitin spojovány C-koncovým glycinem a jedním ze sedmi lyzinů (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63). Výsledný typ řetězení určuje význam této modifikace pro cílový protein. Například řetězec tvořen spojováním K29 nebo K48 je signál pro degradaci v proteazomu. Řetězení přes K63 pak ovlivňuje protein-proteinové interakce. V DDR se uplatňují oba typy řetězení. V místě DSB jsou tvořeny řetězce typu K63, které slouží k nasedání dalších komponent DDR. Po K48 ubikvitinylaci jsou degradovány některé proteiny podílející se na zástavě/restartu buněčného cyklu (např. MDM2, cyklin D1, Claspin) [2]. Zpětné odstraňování jednotlivých ubikvitin ze substrátů popř. jejich řetězců katalyzují tzv. deubikvitinylací enzymy (DUB).

Ubikvitinylaci se v mnohém podobá SUMOylace. Během této PTM je na cílový substrát připojen malý, ubikvitinu příbuzný protein SUMO². Tato reakce probíhá podobně jako ubiquitinylace ve třech krocích, tedy aktivace, konjugace a ligace, také akceptorovou aminokyselinou je lyzin³. Na rozdíl od ubikvitinylace však neoznačuje proteiny určené k proteazomové degradaci. (de)SUMOylace reguluje transport proteinů mezi jádrem a cytoplazmou (např. XRCC4) [3], nebo lokalizaci v buněčných tělískách (komponenty jaderných tělísek PML), kompetuje s ubikvitinem o stejné akceptorové místo (např. vzájemně vylučná SUMOylace/ubikvitinylace K127 kvasinkového PCNA) [4] nebo reguluje interakci mezi proteiny (např. při homologní rekombinaci je SUMOylace proteinu RPA nezbytná pro vazbu RAD51)[5].

PARylace

V časných fázích oprav jednořetězcových zlomů DNA se uplatňuje PARylace, při níž polymeráza PARP katalyzuje postupným spojováním molekul NAD⁺ tvorbu poly(ADP-ribóza) (PAR) řetězců. Depolymeraci těchto těchto PAR řetězců katalyzuje glykosidáza PARG. PARylace je důležitou PTM histonů a dalších proteinů nacházejících se v okolí poškozené DNA, kde tvoří místo pro nasedání některých komponent opravného aparátu (jako např. XRCC1)[6].

2.1.2 Typy poškození DNA a jejich opravy – jednořetězcové zlomy

Některé chemické modifikace nukleotidů vedou ke místním změnám konformace DNA. Největší distorze struktury DNA jsou způsobeny např. alkylačními mutageny. Takto modifikované nukleotidy jsou opravovány mechanismem DRR⁴, během kterého je z nukleotidu tato chemická

² SUMO = small ubiquitin-related modifier; malý modifikátor příbuzný ubikvitinu

³ lyzin je součástí tzv. SUMO vazebného motivu Ψ KXE, kde Ψ je velká hydrofobní aminokyselina a X je jakákoliv aminokyselina

⁴ direct reversal repair

modifikace odstráňena. Jedná se tak o nejjednodušší typ opravy DNA, při kterém nedochází ke štěpení fosfodiesterové vazby a který zároveň nevyžaduje templát (resp. komplementární vlákno).

Další možností poškození DNA jsou jednořetězcové zlomy. Vlákno může být přerušeno buď přímo zničením deoxyribózy, nebo může zlom vzniknout jako meziprodukt jiných mechanismů oprav DNA: BER, NER, RER aj. (viz dále). V principu jsou tyto mechanismy založeny na detekci poškozeného místa a jeho modifikaci následované samotnou opravou. Zatímco detekční a modifikační aparát se pro jednotlivé mechanismy opravy jednořetězcových zlomů liší, velká část proteinů aparátu zajišťující finální opravu je shodná.

BER

Vedou-li chemické modifikace nukleotidů k distorzím ve struktuře DNA malého rázu (např. oxidace, deaminace, alkylace nukleotidů), je poškozené místo opraveno tzv. mechanismem BER, kdy je poškozený nukleotid vyměňen. Hlavní roli v úpravě poškozeného místa hrají DNA glykosylázy a endonukleázy[7].

NER

Některé chemické modifikace (např. UV záření, interkalační činidla) způsobují větší změny v konformaci DNA (např. thyminové dimery), které jsou opravovány pomocí NER. Při něm dochází k rozpoznání poškozených nukleotidů, vyštěpení úseku DNA i s těmito nukleotidy a následné syntéze nové DNA dle komplementárního vlákna. Pro detekci a modifikaci poškozené místa jsou nezbytné proteiny jako např. senzory poškození (XPA, XPC), adaptor XRCC1⁵, poly(ADP-ribóza)-polymeráza PARP, součást E3 ligázového komplexu CSA, helikázy (např. XPB, XPD), endonukleázy (např. XPF, XPG) aj. Dědičné mutace v klíčových komponentách aparátu NER jsou příčinou vzniku onemocnění xeroderma pigmentosum nebo Cockaynův syndrom⁶. Takto postižené osoby jsou mj. velmi citlivé na UV záření a dochází u nich k častému rozvoji rakovin, zejména kožních nádorů. [8].

RER

Vedle modifikací DNA opravovaných pomocí NER a BER mohou být zdrojem jednořetězcových zlomů i další typy poškození. Např. DNA polymeráza je schopna při syntéze DNA použít chybně NTP namísto dNTP. Uvádí se, že až 1×10^6 ribonukleotidů je takto chybně zainkorporováno do genomu během jednoho buněčného dělení savčí buňky. Rozpoznání a vyštěpení těchto inkorporovaných NTP v DNA zajišťuje RNáza H1. [9].

MMR

Speciálním typem oprav je MMR, který hraje důležitou roli v dosahování vysoké přesnosti replikace DNA. Tento mechanismus rozpoznává nukleotidy, které byly po replikaci DNA nesprávně

⁵ z anglického „X-ray cross-complementing gene 1“

⁶ některé proteiny účastní se NER byly pojmenovány právě podle těchto nemocí; např. XPA-XPG, podle xeroderma pigmentosum; CSA a CSB podle Cockaynova syndromu

zařazeny DNA polymerázou (nepárují dle standardního Watson-Crickova párování). Princip mechanismu MMR je velmi podobný mechanismu NER a obdobně i dědičné mutace v proteinech mechanismu MMR vedou ke zvýšené incidenci nádorů (tzv. Lynchův syndrom)[10].

Konečnou fází oprav BER, NER, RER a MMR je syntéza nového vlákna DNA podle komplementárního vlákna komplexem DNA polymeráza/PCNA/XRCC1 následovaného ligací enzymy Lig1 nebo Lig3 α .

Při nefyziologickém zastavení replikačního nebo transkripčního aparátu je DNA dlouhodobě rozvolněna. Tato jednovláknová DNA (ssDNA) je také meziproduktem některých opravných mechanismů (NER, HR). SsDNA je náchylná k tvorbě vlásenek nebo rozštěpení endonukleázami. Ochranu před těmito vlivy zajišťuje navázání proteinů RPA. SsDNAs navázaným RPA je rozpoznáván kinázovým komplexem ATR/ATRIP/TOPBP1 a spouští signalizaci vedoucí k zastavení buněčného cyklu, zejména fosforylací kinázy CHK1 [11].

Některé typy genotoxických stresů vedou ke kovalentnímu spojení obou komplementárních vláken DNA. Pro opravu tohoto typu poškození existuje v buňce speciální komplex helikáz, endonukleáz, E3 ligáz a proteinů remodelujících chromatin. Jádrem tohoto komplexu tvoří 17 proteinů kódovaných tzv. *FANC* geny (např. FANCA, FANCD1) a několik dalších pomocných komponent. Dědičné mutace v těchto *FANC* genech se u lidí projevují tzv. Fanconiho anémií, která se vedle poruch růstu a mentálních poruch projevuje zvýšeným sklonem ke vzniku zhoubných nádorů, zejména akutních leukémií [12].

2.1.3 Typy poškození DNA a jejich opravy – dvojitě zrcovité zlomy

Pravděpodobně nejzávažnějším typem poškození DNA jsou dvojitě zrcovité zlomy (DSB), tedy zlomy, kdy jsou blízko sebe přerušena obě vlákna DNA. Zdrojem těchto zlomů může být přímé působení genotoxických chemikálií/záření popř. kolaps replikačního či transkripčního aparátu. Některé zlomy však mohou vznikat i jako meziprodukt fyziologických dějů, např. při V(D)J rekombinaci, izotypovému přesmyku nebo homologní rekombinaci v meióze. V eukaryotní buňce existují dva hlavní způsoby oprav: nehomologní spojení konců (NHEJ) a homologní rekombinace (HR)⁷.

Mechanismus NHEJ je zodpovědný za opravu 80-85% DSB. Senzorem DSB je heterodimer proteinů Ku70/80. Přerušovaný konec DNA s navázaným Ku60/70 je rozpoznáván kinázou DNA-PK [13], která je na místě aktivována autofosforylací. Aktivovaná DNA-PK pak fosforyluje v místě zlomu histonovou variantu H2A.X [14], [15] a řadu komponent aparátu NHEJ. Po úpravě konců

⁷ další opravný mechanismus pro opravy DSB se nazývá alternativní NHEJ, nebo také MMEJ (microhomology mediated end-joining), který zde však rozebírán nebude.

DNA, kdy je část DNA exonukleoticky odštěpena⁸, jsou oba konce spojeny proteinovým komplexem XRCC4/XLF následovaného ligací samotné DNA ligázou IV [16].

Druhým, přesnějším módem opravy DSB je homologní rekombinace, která však může probíhat pouze v pozdní S nebo G2 fázích buněčného cyklu, kdy je přítomno sesterské vlákno DNA. Celkově se HR na opravách DSB podílí z 15-20%. Ačkoliv je na rozdíl od NHEJ pomalejší (a zároveň se jí účastní mnohonásobně více proteinů), nedochází zde ke ztrátě DNA. Podobně jako v předchozím případě je signální kaskáda spuštěna detekcí dvojřetezcového zlomu. Zde hraje hlavní roli komplex proteinů MRN a MDC a dále aktivace apikální kinázy ATM (kináze ATM je věnovaná samostatná podkapitola 2.1.5). ATM fosforyluje variantu histonu H2A.X a to až do vzdálenosti několika kilobází od samotného místa zlomu [14]. Do takto modifikovaného místa zlomu se váží E3 ligázy (RNF8, RNF168) a spouští vlnu polyubikvitinylací [17] opravných proteinů. V dalším kroku se na polyubikvitinové řetězce naváže mj. protein BRCA1 nebo 53BP1. Tyto dva proteiny spolu kompetují o vazebné místo, což rozhoduje o způsobu opravy zlomené DNA. BRCA1 iniciuje resekci 5'-konce DNA, který je odbourán nukleázami⁹ za pomoci DNA helikáz¹⁰. Výsledná 3'-ssDNA je chráněna před tvorbou vlásek a naštěpením nukleázami proteinem RPA. Komplex BRCA2/PALB2 iniciuje navázání RAD51 a následuje hledání homologního úseku DNA. Samotná homologní rekombinace pak probíhá podobně jako rekombinace meiotická. Navázaný 53BP1 naopak brání kompetici s BRCA1 resekci 5'-konce DNA (a následné homologní rekombinaci) a iniciuje naopak dokončení opravy zlomu mechanismem SSA¹¹ [18].

2.1.4 Charakterizace a využití látek a záření poškozujících DNA

Ke studiu opravných mechanismů se v laboratoři používá celá škála chemikálií (popř. fyzikálních agens) poškozujících DNA přímo nebo nepřímo.

Hydroxyurea (HU) inhibuje enzym ribonukleotid reduktázu, čímž snižuje koncentraci dostupných dNTP k syntéze DNA a zastavení replikační vidličky. Obnažená ssDNA pak spouští signalizaci aktivací kinázy ATR. K poškození DNA *per se* však samotným působením HU nedochází [19]. Na podobném principu funguje i metotrexát, který však inhibuje enzym dihydrofolát reduktázu, což vede ke snížení dostupného nukleotidu dTTP [20]. Rovněž 5-fluorouracil (5-FU) snižuje koncentraci dTTP (inhibicí thymidylát syntázy), což vede k zastavení replikační vidličky. Snížená koncentrace dTTP vede navíc k poruše rovnováhy dTTP/dUTP a nadbytkový dUTP je chybně

⁸ důvodem tohoto štěpení je hledání mikrohomologie mezi oběma konci DNA

⁹ např. nukleáza DNA2 nebo EXO1

¹⁰ např. helikáza BLM nebo WRN

¹¹ z anglického „single strand annealing“

inkorporován do syntetizované DNA namísto dTTP. Zároveň jsou během S-fáze inkorporovány do DNA meziproducty odbourávání 5-FU. DNA obsahující dUTP nebo 5-FU vede k pozdější aktivaci mechanismu NER, jenž však nemůže při současném nedostatku dTTP opravu DNA dokončit, což vede k akumulaci dalších jednořetězcových zlomů [21].

Topoizomerázové jedy tvoří další skupinu chemikálií poškozujících DNA. Doxorubicin a etoposid (VP16) se vážou na komplex DNA/topoizomeráza-II a po rozštěpení DNA zabraňují její zpětné ligaci. Výsledkem je dvojřetězový zlom s kovalentně navázaným enzymem na konci DNA. Camptotecin interaguje s komplexem topoizomerázy I a jí vytvořeném SSB a inhibuje re-ligaci tohoto SSB. Výsledkem je překážka pro replikační aparát ve formě topoizomerázy kovalentně spojené s DNA [22].

Další skupinou jsou chemikálie, které způsobují zlomy přímo v DNA. Enediynová antibiotika způsobují směs SSB a DSB. Např. neocarzinostatin (NCS) má poměr DSB:SSB 1:6, zatímco calicheamicin nebo C-1027 dokonce 1:2 [23]. Strukturně nepříbuznými antibiotiky, které rovněž způsobují zlomy v DNA jsou antibiotika z bleomycinové rodiny. U nejčastěji používaného bleomycinu byl poměr DSB:SSB odhadnut na 1:6¹² [24].

Některá cytostatika, jako je např. karbustin, dusíkatý yperit, mitomycin C nebo cisplatina a její deriváty způsobují kovalentní spojení komplementárních vláken DNA. Výsledný spoj je překážkou pro replikační i transkripční aparát.

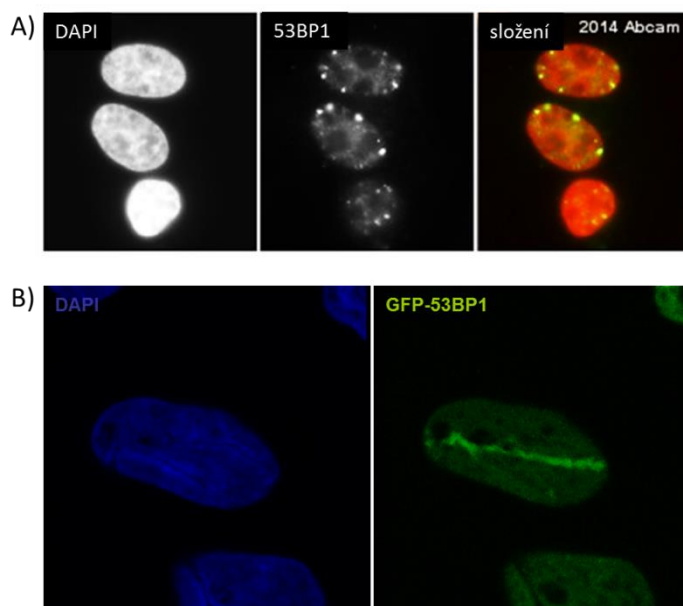
Z fyzikálních agens se pro poškození DNA nejčastěji používá UV záření a ionizační záření (IR). UV záření vede k tvorbě thymidinových dimerů a následné aktivaci NER. Ionizační záření (záření γ) indukuje v buňkách tvorbu volných, vysoce reaktivních radikálů (např. OH^\cdot či OH^\cdot) v bezprostřední blízkosti DNA, které pak mohou způsobovat její štěpení. Výsledkem je směs DSB a SSB, jejíž poměr se uvádí mezi 1:10 až 1:100. Tento poměr lze ovlivnit dávkou (vyšší dávky vedou k častějším DSB) a typem použitého IR. Záření s vysoce lineárním přenosem energie (LET¹³), jako např. α -částice, neutrony, vede k vyššímu poměru DSB/SSB, než použití záření typu (záření γ , paprsky X) s nízkým LET [25], [26] Ačkoliv IR není zdrojem jednoho typu poškození, zůstává jeho výhodou (podobně jako u UV záření) rychlý účinek (řádově vteřiny až minuty) oproti mnohaminutovým až několikahodinovým inkubacím buněk s chemickými induktory.

H_2O_2 stejně jako ionizačního záření vede k tvorbě ROS (zejména hydroxylových radikálů), ale na rozdíl od IR nezpůsobuje DSB [27]. Hydroxylové radikály nejsou produkovány v klastrech v blízkosti DNA jako po IR ale spíše jsou v buňce distribuovány rovnoměrně difuzí a jsou významným zdrojem SSB [28].

¹² u zástupců obou rodin těchto antibiotik byl poměr SSB:DSB stanovován použitím indukce zlomů v plasmidové DNA. Tento poměr se tak může oproti *in vivo* zlomům v genomové DNA lišit.

¹³ z anglického „linear energy transfer“

Pro vizualizaci poškozené DNA se používá často fluorescenční mikroskopie. Poškozené místo spolu s navázanými proteiny jednotlivých reparačních mechanismů se nazývá „DNA léze“. Po použití výše popsaných prostředků jsou jednotlivé léze delokalizované (Obrázek 1), což může být v některých případech nevýhodou¹⁴. Pro lokalizované poškození DNA složeného hlavně z DSB je možné použít také tzv laserovou mikroiradiaci. Buňkám je podán BrdU a po jeho zainkorporování do nově zreplikované DNA jsou jádra buněk ozářena UV-A laserem. Tuto metodu lze aplikovat i na živé buňky ke sledování dynamiky opravných mechanismů, a to již od prvních vteřin po poškození [29].



Obrázek 1: Vizualizace poškozené DNA. A) po inkubaci buněk s bleomycinem tvoří protein 53BP1 tzv. DNA léze (zdroj: Abcam). B) po laserové mikroiradiaci tvoří stejný protein podélnou „jizvu“ (zdroj: vlastní archiv).

2.1.5 Apikální kináza ATM

Kináza ATM patří k základním kamenům signální dráhy spouštěné genotoxickým stresem. ATM byla identifikována v roce 1995 [30], jako příčina syndromu ataxia telangiectasia. Toto vzácné autozomálně recesivní onemocnění je způsobené mutacemi ATM genu. Syndrom ATM se projevuje progresivní neurodegenerací (zejména mozečku), dilatací cév, imunodeficiencí a v neposlední řadě zvýšenou citlivostí na ionizační záření doprovázenou chromosomovou nestabilitou a zvýšenou incidencí vzniku rakovin.

Kináza ATM je členem IV. třídy PI3 kináz¹⁵, mezi jejíž další členy patří kináza ATR, DNA-PK a mTOR. Všechny tyto kinázy preferenčně fosforylují serin nebo treonin následovaný glutaminem (tzv. S/T-Q popř. SQ/TQ motiv). Kináza ATM se v neaktivním stavu vyskytuje ve formě

¹⁴ některé jaderné proteiny mohou být za nestresových podmínek koncentrovány v některých jaderných tělíscích nebo velkých proteinových komplexech, jejichž signál by interferoval s indukovanými DNA lézemi

¹⁵ phosphoinositide 3-kinase; fosfatidylinositol-3-kinázy

homodimeru. K aktivaci dochází po monomerizaci, autofosforylaci (S367, S1893, S1981 a S2996) [31], [32] a acetylaci K3016 acetyltransferázou KAT5/Tip60 [33]. Přesný molekulární mechanismus aktivace ATM není znám, nicméně esenciální úlohu zde hraje vazba komplexu MRN¹⁶ na poškozenou DNA [34], [35]. Aktivovaná ATM pak fosforyluje řadu komponent účastnících se přímo či nepřímo opravy DNA, tedy samotné opravné proteiny (např. H2AX, BRCA1 či MDC1) či proteiny spjaté se zástavou buněčného cyklu (např. CHK1+2, CDC25A) [1]. Mezi substráty ATM a dalších apikálních kináz DDR existuje jak redundance (např. všechny apikální kinázy mohou fosforylovat histon H2AX), tak i exkluzivita, kdy specifické proteiny jsou výlučným substrátem pouze určité kinázy (např. KAP je fosforylován na S824 pouze kinázou ATM) [36]. Vedle opravy dvojřetězcových zlomů hraje kináza ATM důležitou roli i při udržování a ochraně telomer [37]. Telomerická DNA je za normálních okolností chráněna proteinovým komplexem zvaným „shelterin“, jehož klíčovou komponentou je mj. protein TRF1. V buňkách s nefunkční kinázou ATM se TRF1 akumuluje mimo telomery, které nechráněné pak podléhají abnormálnímu zkracování nebo telomerickým fúzím [38], [39].

2.1.6 Úloha p53 v DDR

Transkripční faktor p53 byl objeven před více než třiceti lety a patří mezi nejvíce studované proteiny. U lidí vedou dědičné LOF¹⁷ mutace/delece *TP53* k rozvoji Li-Fraumeniho syndromu, jenž je charakterizován zvýšeným rizikem rozvoje rakovinného bujení. Podobně se pak projevuje K/O delece *Trp53*¹⁸ u myší, které mají významně zkrácenou dobu života právě kvůli častému rozvoji nádorů [40]. Jeho protinádorovou funkci zároveň dokládá fakt, že téměř polovina nádorů nese mutaci v genu *TP53* [41].

Aktivita p53 je kontrolována na několika úrovních, z nichž nejvýznamnější jsou regulace stability proteinu a regulace aktivity posttranslačními modifikacemi. V nestresovaných buňkách je hladina proapoptotického nádorového supresoru p53 udržována na nízké úrovni. Děje se tak jeho kontinuální proteasomovou degradací. Naopak v buňkách vystavených např. genotoxickému stresu je protein stabilizován. Tato stabilita p53 je mimo jiné regulována (de)ubiquitylací proteázou HAUSP a E3 ligázou MDM2 [42], [43], [44]. MDM2 má zároveň i autoubikvitylační aktivitu a je tak sama sobě negativním regulátem [45]. Vedle MDM2 byly popsány ještě dvě E3 ligázy ubikvitinylující p53: COP1 a PIRH2. Mechanismus degradace p53 založený na těchto ligázách zatím nebyl doposud dostatečně charakterizován [46].

¹⁶ MRN je komplex proteinů Mre11, Rad50 a NBS1

¹⁷ LOF z anglického „loss of function“; tedy mutace, které vedou ke ztrátě původní funkce proteinu

¹⁸ název myšího genu pro p53

Z posttranslačních modifikací byly u p53 popsány fosforylace, acetylace, ubikvitinylace, metylace, NEDDylace a SUMOylace [47], [48]. Pro shrnutí těchto modifikací a jejich funkcí viz Obrázek 2.

Regulace buněčného cyklu/senescence

Nejvíce prostudovaným regulátorem buněčného cyklu závislého na p53 je p21^{WAF}. Tento protein pak dále inhibuje jednak aktivitu cyklin-dependentních kináz [49], ale také svou vazbou na PCNA inhibuje replikaci DNA [50], čímž zastavuje buněčný cyklus v G1 a S fázi. Méně prostudovaným transkripčním cílem p53 je *CCNG1*¹⁹ [51], který rovněž zastavuje cyklus v G1 fázi. Mezi geny regulované p53, které se podílejí na zástavě buněčného cyklu v G2 popř G2/M fázi, patří např. *YWHAS*²⁰ [52], [53], *RPRM*²¹ [54], *GADD45A* [55]. Vedle proteinů se p53 podílí i na transkripci mikroRNA, z nichž nejvýznamější vliv na zástavu buněčného cyklu mají miRNA-34a+b+c [56], [57].

Indukce apoptózy

Protein p53 je schopen indukovat apoptózu přímo aktivací transkripce proapoptotických genů *BAX*, *PUMA*, *NOXA*, *APAF1* a dalších [58]. Nepřímo se pak na indukci apoptózy podílí transkripcí genů *PIG3*, *PIG6* nebo *FDXR*, jenž zvyšují hladinu vnitrobuněčných ROS [59], [58]. Také byly popsány netranskripční indukce apoptózy či regulované nekrózy přímou interakcí p53 s proapoptotickým BAX, BAK či cyclophilinem D na mitochondriích [60].

Negativní zpětná vazba

Aby mohly buňky po úspěšné opravě poškozené DNA znovu nastartovat buněčný cyklus, je potřeba ukončit signální kaskádu DDR. P53 aktivuje několik genů účastnících se této negativní zpětné vazby. Vedle E3 ligázy MDM2 jsou to např. E3 ligáza SIAH1, cyklin G nebo fosfatáza WIP1 [58], [61], [62].

Regulace metabolismu, produkce energie a homeostáze

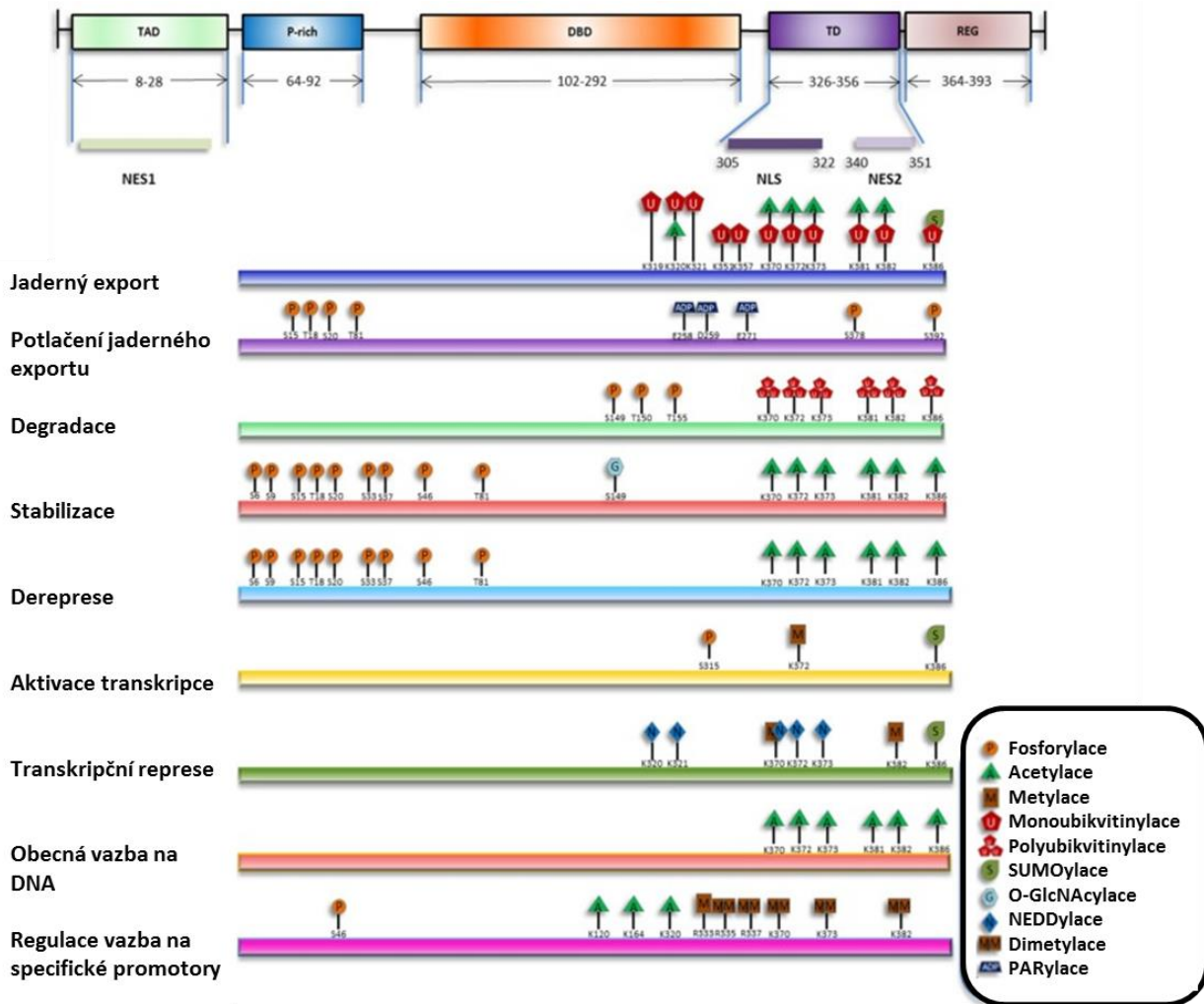
Na kontrole metabolismu se p53 podílí několika způsoby. Pozitivně reguluje autofágií transkripcí *DRAM1*. Zvýšená autofágie pak slouží k odstraňování poškozených organel, které (např. poškozené mitochondrie) by mohly být potenciálním zdrojem ROS. Autofágií může být také selektivně odstraněn přebytek ribosomů. Snížení proteosyntetického aparátu pak vede k zpomalení růstu buněk [63], [64].

Fyziologická hladina p53 také udržuje bazální transkripci *SCO2*, který je nezbytný pro tvorbu mitochondriálního komplexu IV. P53 tak podporuje oxidativní fosforylaci. Právě nerovnováha v

¹⁹ produktem genu je protein cyklin G1

²⁰ produktem genu je protein 14-3-3σ

²¹ produktem genu je protein REPRIMO



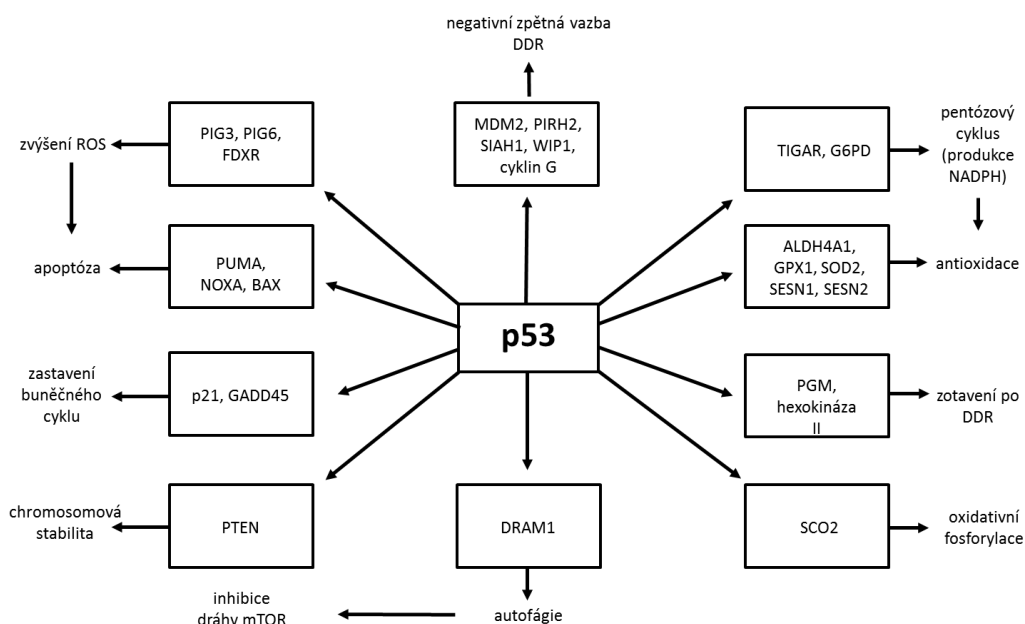
Obrázek 2: Shrnutí PTM transkripčního faktoru p53 a jejich vlivu na funkci. Zkratky: N-koncová transaktivační doména (TAD); oblast bohatá na prolin (P-rich); doména vázající DNA (DBD); tetramerizační doména (TD); C-koncová regulační doména (REG). Upraveno dle [48].

metabolismu glukózy daná zvýšením čisté glykolýzy na úkor oxidativní fosforylace je jedním z atributů nádorových buněk. Metabolismus glukózy je však regulován pomocí p53 i jiným způsobem – transkripcí genů *TIGAR* nebo *PGM*, jenž odvádějí meziproducty glykolýzy do pentozafosfátového cyklu. Produkty tohoto cyklu jsou jednak prekurzory nukleotidů důležité pro syntézu opravované DNA a jednak antioxidantní NADPH [65], [66].

Regulace ROS

Při fyziologické míře oxidačního stresu funguje p53 jako pozitivní regulátor antioxidantních genů (např. *GPX1*, *ALDH4A1*, *SESN2* aj.). Při zvýšené míře oxidačního stresu spojené s výrazným poškozením DNA či organel (např. mitochondrií) pak naopak spouští expresi prooxidačních genů *PIG3*, *PIG6* nebo *FDXR* a funguje tak jako proapoptotický regulátor [67].

P53 tedy reguluje transkripci genů účastnících se řady buněčných funkcí: regulace buněčného cyklu, indukce apoptózy nebo senescence, oprava DNA či regulace metabolismu a homeostázy (Obrázek 3). Původní teorie předpokládala, že protinádorová funkce p53 spočívá ve stresem-stimulované transkripci genů indukujících dočasné zastavení buněčného cyklu popř. genů prosenescentních či proapoptotických. Poškozené buňky, které by se jinak mohly transformovat v buňky rakovinné, tak mají více více času na opravu. V případě velkého poškození jsou pak eliminovány z organismu apoptózou nebo je u nich navozeno permanentní zastavení buněčného cyklu. Důležitý poznatek ale přinesla studie [68], ve které byla bodovými mutacemi zablokována schopnost přepisovat geny z těchto tří skupin, zatímco transkripce genů metabolických byla zachována. Tyto myši však spontánní nádory nevytvářely. V současné době se tedy předpokládá, že preventivní protinádorová funkce p53 spočívá v transkripci genů kontrolujících metabolickou homeostázi.



Obrázek 3: Schematické znázornění transkripčních cílů p53.

2.2 Adaptorový protein DAXX

Adaptorový protein DAXX byl objeven na konci 90. let nezávisle několika skupinami, které jej identifikovaly pomocí dvouhybridového kvasinkového systému jako vazebného partnera receptoru Fas, centromerového proteinu CENP-C nebo DNMT1 [69], [70], [71].

Mezidruhově je DAXX u obratlovců konzervovaný protein (Obrázek 4), který však nepatří do žádné dosud známé rodiny proteinů a také nemá enzymatickou aktivitu. Jeho gen je v lidských buňkách lokalizován na chromosomu 6. Výsledný protein má po translaci 740 aminokyselin a

teoretickou molekulovou hmotnost 81 kDa. Jeho elektroforetická mobilita na SDS-PAGE je však okolo 120 kDa. Vedle majoritní 120 kDa isoformy popsali Wethkamp et al. [72] dvě minoritní vznikající alternativním sestřihem šestého exonu. Transkripty nazývané DAXX- β a DAXX- γ mají 647 resp. 653 aminokyselin. Přítomnost těchto alternativních transkriptů však byla prokázána pouze u několika buněčných linií a to jen v nepatrném množství. Pakli-že však byly tyto isoformy v buňkách nadprodukovány, nebyly schopné kolokalizovat s tělísky PML (viz níže). Právě ve zkráceném C-konci se nachází SIM esenciální pro tuto lokalizaci DAXX do tělísek PML.

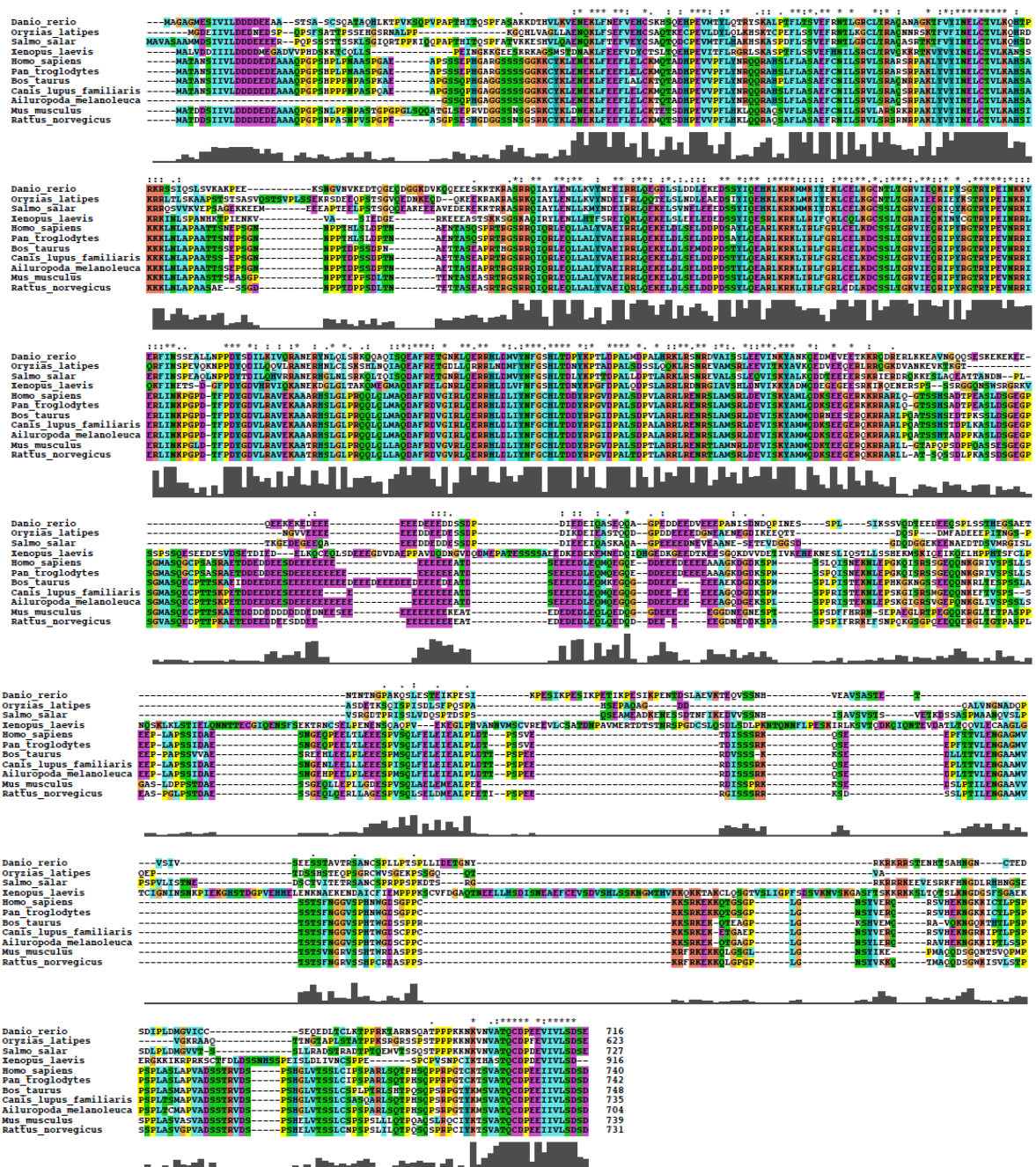
Exprese DAXX je poměrně rovnoměrná ve většině lidských i myších tkání. Pouze ve varlatech, T-lymfocytech a u lidí navíc i v B-lymfocytech je jeho hladina významně zvýšená²². V buňkách je pak jeho majoritní část lokalizována v tělískách PML [73]. Hlavními komponentami těchto jaderných tělísek jsou kromě DAXX dále proteiny PML, SP100, HP1, ATRX a BLM [74], [75]. V těchto tělískách dochází k postranlačním modifikacím některých proteinů nebo regulaci konformace chromatinu.

Domény a posttranslační modifikace

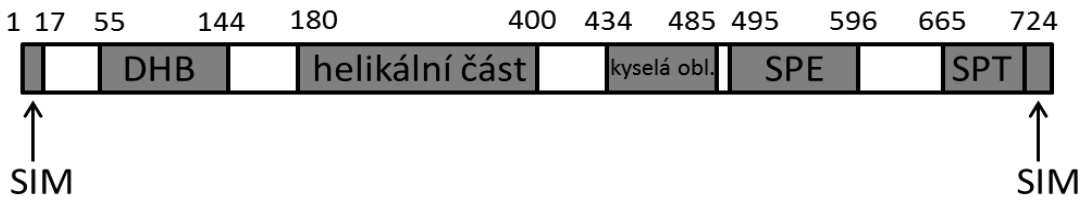
Nejlépe prostudovanou oblastí DAXX je helikální histon-vazebná doména (HBD) (Obrázek 5) mezi aminokyselinami 184 až 390. Je tvořena šesti α -helixy, jejichž struktura a vzájemná orientace byly podrobně zmapovány pomocí rentgenové krystalografie [76]; [77]; [78] (viz podkapitola 2.3.2). Vedle HBD je známá trojrozměrná struktura rovněž pro oblast mezi aminokyselinami 55-144. Ta je tvořena čtyřmi amfipatickými helixy zprostředkovávající interakci s nádorovým supresorem RASSF1C. Další významnou doménou jsou dva motivy SIM, které umožňují vazbu DAXX například na některé SUMOylované transkripční faktory (např. SMAD4, CBP) [79]; [80] nebo jeho lokalizaci v tělískách PML vazbou na SUMOylovaný protein PML [81]. Pro lokalizaci DAXX v jádře je pak nezbytný NLS. Úloha domén bohatých na serin a prolin (SPE a SPT) a kyselé oblasti není zatím známá.

Z posttranslačních modifikací byly u proteinu DAXX doposud popsány zejména SUMOylace a fosforylace. Ani u jedné z těchto PTM však nejsou jejich funkce dostatečně prostudovány. Vliv SUMOylace na lokalizaci nebo funkci proteinu DAXX není znám vůbec, zvyšuje se však po infekci cytomegalovirem účinkem virového pp71 [82]. Fosforylace pak byla popsána jak konstitutivní (S219, T472, S515, T523, S626) [83], tak indukovaná. Např fosforylace S669 kinázou HIPK1 reguluje kotranskripční funkci adaptoru DAXX [83, 84]

²² dle portálu BioGPS: <http://biogps.org>



Obrázek 4: Aminokyselinový alignment 11 sekvencí adaptoru DAXX z 11 druhů obratlovců. Alignment byl vytvořen v programu ClustalOmega.



Obrázek 5: Schematické znázornění domén adaptoru DAXX. SIM - SUMO interacting domain (doména interagující se SUMO), DHB - DAXX helical bundle (helikální část), SPE – oblast bohatá na serin, prolin a glutamát, SPT - oblast bohatá na serin, prolin a threonin.

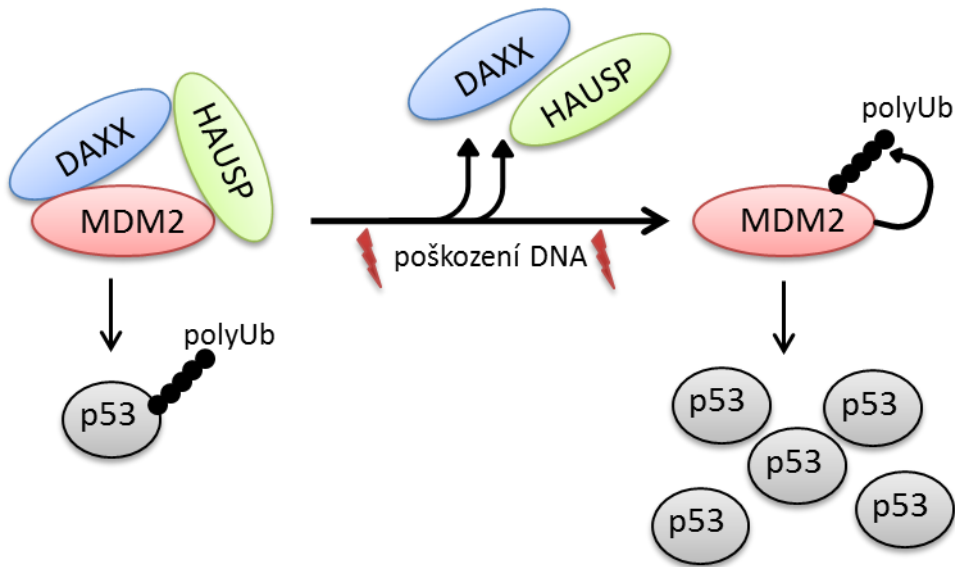
2.3 Popsané funkce DAXX

2.3.1 DAXX jako adaptor ubikvitinových ligáz/proteáz

Komplex DAXX-MDM2-HAUSP-p53

Proteinová stabilita p53 je zejména kontrolována jeho (de)ubikvitinylací kompeticí enzymů E3 ligázy MDM2 a ubikvitin hydrolázy HAUSP (viz podkapitola 2.1.6) [85]; [44]. V roce 2006 identifikoval Tang et al. adaptor DAXX jako klíčovou součást tohoto regulačního mechanismu [86]. Po snížení/depleci DAXX pomocí K/D (resp. K/O) v buňkách U2OS (resp. MEF) pozorovali sníženou stabilitu MDM2 doprovázenou zvýšenou stabilitou p53. Hmotnostní spektrometrie pak identifikovala resp. potvrdila HAUSP jako další součást komplexu, která přímo interaguje s DAXX.

Přepínání mezi degradací/stabilizací p53 je tak kontrolováno sofistikovanou souhrou proteinů: v nestresových podmínkách je p53 v komplexu s MDM2/DAXX/HAUSP. Proteáza HAUSP stabilizuje MDM2 kontinuálním odstraňováním jeho polyubikvitinových řetězců, zatímco MDM2 destabilizuje p53. Po stresu se tento komplex rozpadá, MDM2 je po autoubikvitinylaci degradován, což vede ke stabilizaci p53 (Obrázek 6).

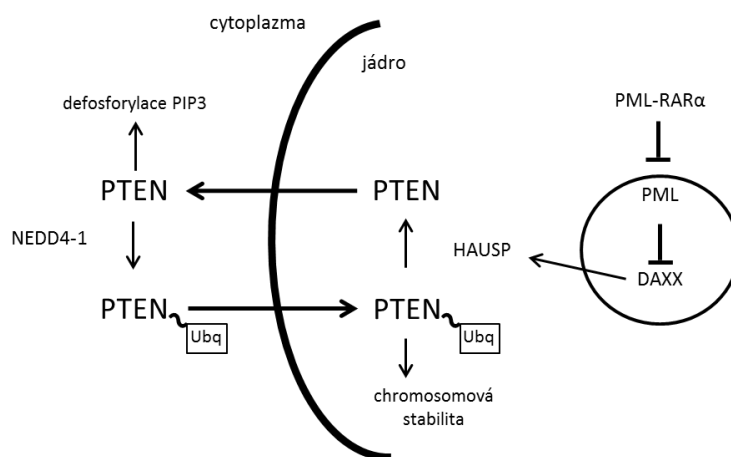


Obrázek 6: model regulace stability p53 po poškození DNA. V nestresových podmínkách je E3 ligáza MDM2 stabilizovaná v komplexu DAXX/HAUSP/MDM2 a ubikvitinyluje p53. Během DDR je MDM2 degradován, což vede ke zvýšení hladiny p53.

Komplex PTEN-DAXX-HAUSP

Fosfatáza PTEN je nádorový supresor, který je exprimován ve většině tkání. Delece/mutace v genu jsou časté v nádorech, např. glioblastomech nebo karcinomech dělohy, prsu a prostaty [87],

[88], [89]. Na molekulární úrovni PTEN defosforyluje lipidového druhého posla PIP(3)²³ a je tak negativním regulátorem signální dráhy AKT/PKB/mTOR řídící buněčnou proliferaci, růst a přežívání [90]. Buňky s homozygotně deletovaným *PTEN* však vedle zvýšené aktivity dráhy AKT vykazují i chromosomovou nestabilitu [91]. Molekulární podstata této nestability byla objasněna v studiích Trotman et al. [92] a Shen et al. [93]. PTEN je v cytoplasmě monoubikvitinylován E3 ligázou NEDD4-1²⁴. Takto modifikovaný PTEN je translokován do jádra, kde se pak spolu s proteinem CENP-C podílí na udržování stabilních kinetochorů. Ztráta PTEN vede k chromosomálním zlomům v oblasti centromer a následné chromosomové nestabilitě. Jeho další jadernou protinádorovou funkcí je aktivace transkripce *RAD51*. V tomto případě vede jeho ztráta ke zvýšenému vzniku spontánních DSB. Jak bylo ukázáno, mutace nebo delece v *PTEN* významně postihují jeho cytoplasmatickou i jadernou funkci. Proto byl překvapivý objev aberantní lokalizace nemutovaného PTEN [94] v určitém typu agresivní leukémie (akutní myelodní leukémie exprimující fúzní protein PML-RAR). Ačkoliv PTEN nebyl v těchto buňkách mutován, byl neznámým mechanismem zadržován v cytoplasmě. Ukázalo se, že důležitou roli v nukleární/cytoplasmatické lokalizaci PTEN hraje komplex DAXX/HAUSP. Jaderný DAXX vychytává za normálních okolností HAUSP do tělísek PML. Leukemické buňky exprimující PML-RAR nejsou schopny tvořit tělíska PML a volný HAUSP pak deubikvitinyluje PTEN. Ten je translokován zpět do cytoplasmy (Obrázek 7). Jeho jaderná funkce zajišťující chromosomovou stabilitu je tak kompromitována i přes to, že je plně funkční. Tento efekt je možné zvrátit inkubací buněk v ATRA²⁵ nebo As₂O₃ – chemikáliemi, které jsou schopné degradovat PML-RAR a obnovit tvorbu tělísek PML.



Obrázek 7: Relokalizace PTEN je regulována monoubikvitinylací. Bližší je tato regulace vysvětlena v textu (viz výše).

²³ phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate

²⁴ neural precursor cell expressed, developmentally downregulated-4-1

²⁵ z anglického „all-trans-retinoic acid“; kyselina retinoová

2.3.2 DAXX a remodelace chromatinu

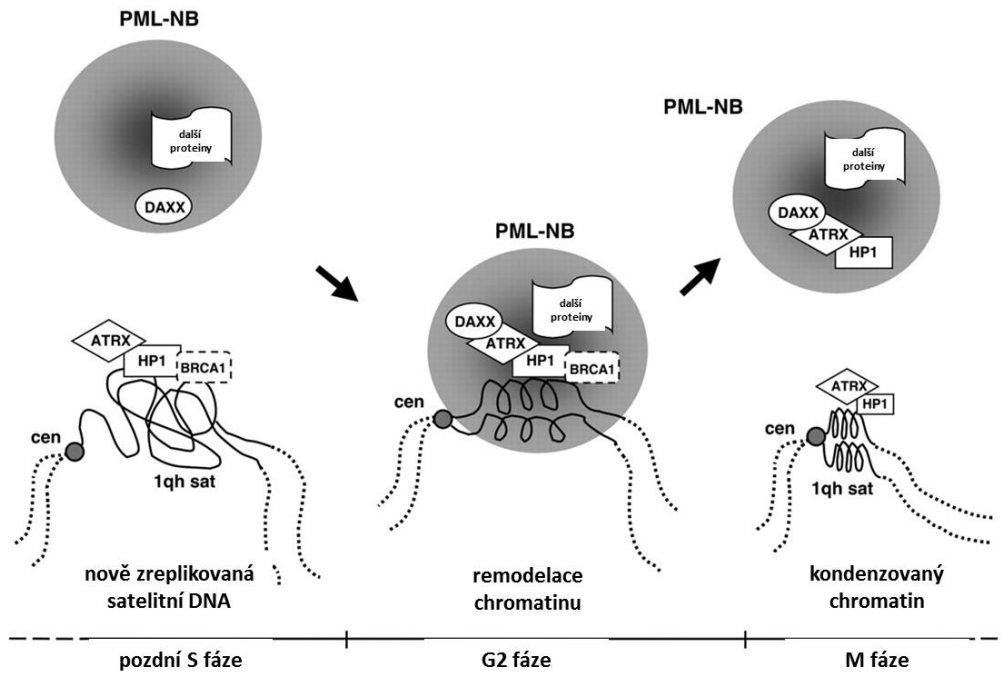
Komplex DAXX/ATRAX:

ATRAX je chromatin remodelující ATPáza patřící do rodiny SWI/SNF²⁶. Mutace/delece v genu této ATPázy vede u lidí ke vzniku tzv. α -talasémie spojené s retardací vázanou na chromosom X. Vedle samotné mentální retardace a mírné α -talasémie patří mezi další symptomy zpožděný vývoj, obličejový dysmorfismus a mikrocefalie. Na buněčné úrovni je pak mutace/delece ATRAX spojena sníženou expresí α -globinu, aberantním vzorem metylace DNA [95], [96] a chromosomovou nestabilitou. Tato nestabilita byla potvrzena na lidských i myších buňkách. Delece ATRAX v myších oocytech RNA interferencí vedla k častým zlomům chromosomů v oblasti centromer a následné aneuploidii [97]. Cílená delece ATRAX pomocí rekombinázy CRE v lidských i myších neuronálních prekuzorech nebo delece pomocí siRNA v buňkách HeLa vedla k abnormální segregaci chromosomů během mitózy a tvorbě mikrojader [98]. Wong et al. [99] ukázal, že ATRAX je esenciální pro ukládání histonové varianty H3.3 do telomer během S-fáze. Po depleci ATRAX docházelo ke zvýšenému poškození DNA právě v oblasti telomer.

V roce 2003 vyšla studie [100], ve které autoři pomocí hmotnostní spektrometrie analyzovali v buňkách HeLa proteiny asociované s ATRAX. DAXX byl identifikován jako jeden z interakčních partnerů. V jádře kolokalizoval s ATRAX v tělískách PML. Nezávislá studie [101] pak následující rok pomocí stejné metody identifikovala ATRAX jako interakční partner adaptoru DAXX a tento komplex rovněž kolokalizoval s tělísky PML. Ve stejném roce byla existence komplexu DAXX/ATRAX/PML potvrzena i na myších embryonálních fibroblastech [102]. MEF *DAXX*^{-/-} měly signifikantně zkrácenou S-fázi, aberantní lokalizaci ATRAX a zvýšený počet dvojitých jader. Dále autoři analyzovali chování tohoto komplexu během buněčného cyklu. Dle výsledků navrhli model, dle kterého DAXX opouští po replikaci DNA tělíška PML a kolokalizuje s ATRAX na heterochromatinu. Během G2 fáze se pak vrací zpět do tělísek PML. Podobný model, avšak v lidských buňkách, navrhli i Luciani et al. [103]. V buňkách lidské akutní leukémie se komplex DAXX/ATRAX/PML podílel během G2 fáze na tvorbě heterochromatinu z pericentromerické satelitní DNA. Zajímavostí také je, že časté mutace proteinů tohoto komplexu byly identifikovány ve specifických typech nádorů, kde výskyt mutací v genech *DAXX/ATRAX* pozitivně koreloval s výskytem ALT (viz podkapitola 2.4). Molekulární mechanismus vzniku ALT v těchto nádorech zatím není znám. Předpokládá se však, že důležitou role zde mohou hrát TERRA²⁷, jejichž transkripci ATRAX potlačuje [104], [105]. Také není jasné, proč je ztráta funkčního komplexu DAXX/ATRAX doprovázena vznikem ALT pouze u některých specifických nádorů a není globálního charakteru [106].

²⁶ z anglického „switch/sucrose nonfermenting-type 2“

²⁷ telomeric repeat-containing RNA; nekódující RNA vzniklé přepisem telomerických oblastí



Obrázek 8: Úloha DAXX/ATRAX při remodelaci chromatinu - model navržený Luciani et al. [103]. Po replikaci DNA se pericentromerická satelitní DNA s navázanými proteiny ATRX/HP1 aj. dostává do tělísek PML (díky interakci DAXX – ATRX). V tělískách dochází během G2 fáze k remodelaci (kondenzaci) satelitní DNA.

2.3.3 DAXX jako chaperon histonů

Jaderná DNA je uspořádaná v nukleozomech, jehož proteinové jádro tvoří oktamery histonů H2A, H2B, H3 a H4. Vedle těchto základních (kanonických) histonů mohou být součástí nukleozomů i jejich jiné varianty, které se liší délkou i sekvencí. Vedle kanonického H2A se tak v buňkách vyskytuje i varianta macroH2A účastnící se inaktivace chromosomu X [107], [108] či varianta H2A.Z, jež se např. podílí na stabilitě centromer [109] nebo udržování hranice mezi heterochromatinem a euchromatinem [110]. Další variantou je H2A.X, jež hraje nezastupitelnou roli při opravách poškozené DNA (viz podkapitola 2.1.3). U histonu H3 byly doposud popsány 4 varianty: CENP-A, H3.1, H3.2 a H3.3. Sekvenčně nejvíce odlišným je centromerický CENP-A, jež se účastní tvorby kinetochoru [111]. Zbylé tři varianty se mezi sebou liší jen malým počtem aminokyselin. Například mezi H3.1 a H3.3 je rozdíl pouze ve čtyřech aminokyselinách a přesto se velmi liší ve způsobu tvorby nukleozomů. Zatímco H3.1 se inkorporuje do nukleozomů výlučně v S-fázi, a je tedy závislý na replikaci DNA, tak varianta H3.3 je ukládána do nukleozomů v průběhu celého buněčného cyklu, a to jak závisle, tak i nezávisle na replikaci DNA [112]. Tyto výměny histonů v nukleozomech jsou zprostředkovány tzv. histonovými chaperony, tedy proteiny, popř. jejich

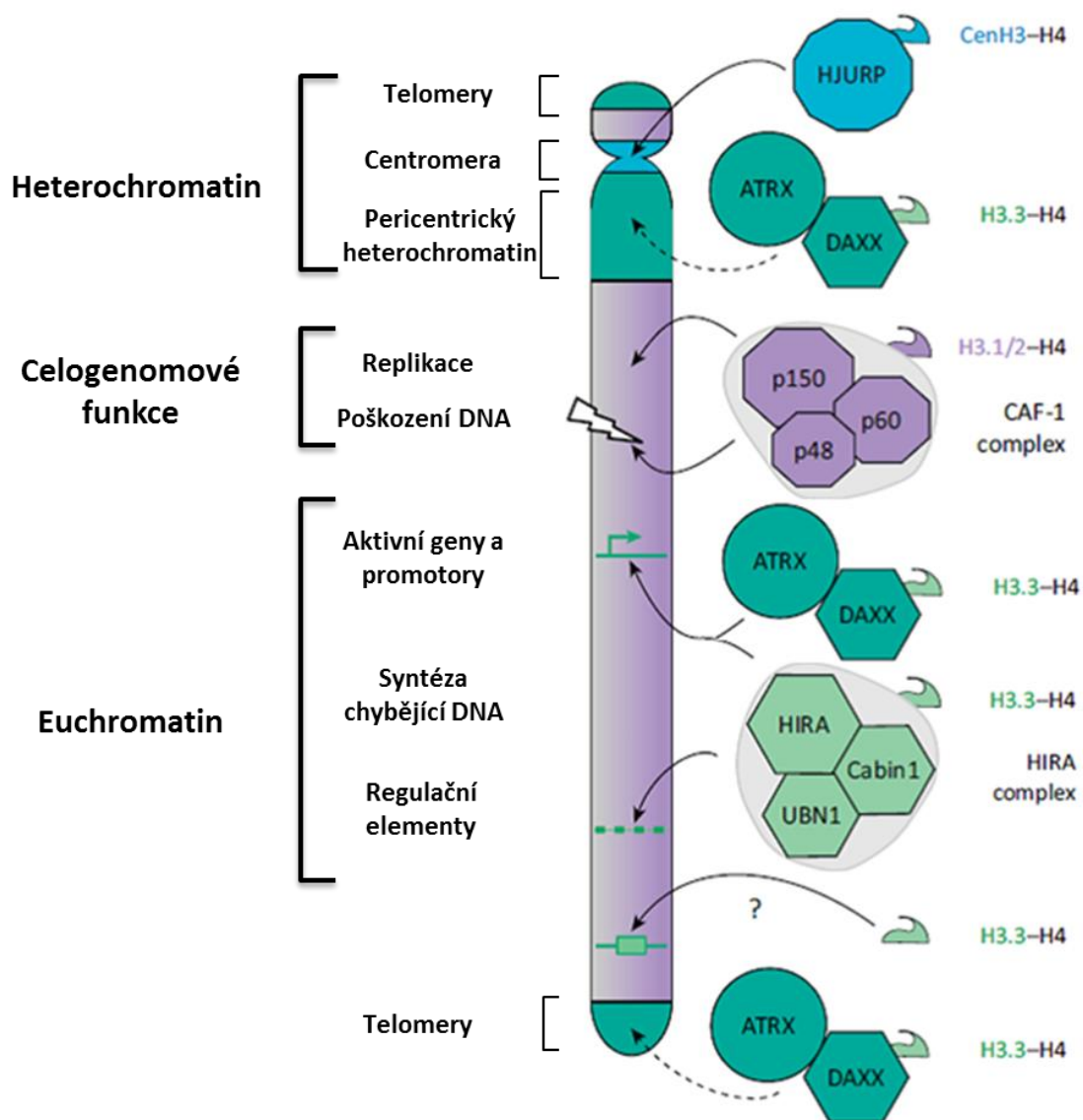
komplexy, které napomáhají formování histonů a DNA do nukleozomů. Prvními popsánymi chaperony interagujícími s histonem H3.3 byly ASF1A+B a HIRA [113], [114].

V roce 2010 pak dvě na sobě nezávislé studie [115], [105] ukázaly, že pro variantu H3.3 existuje v buňkách třetí histonový chaperon: komplex adaptorového proteinu DAXX a ATRX. V první studii byl u nediferencovaných ESC²⁸ a NPC²⁹ buněk komplex DAXX/ATRX výhradním chaperonem ukládajícím H3.3 do míst pro vazbu transkripčních faktorů a rovněž do telomerických oblastí chromosomů. Paralelní studie pak ukázala, že v myších embryonálních fibroblastech a v nádorové linii HeLa komplex DAXX/ATRX/H3.3 pozitivně reguloval transkripci pericentrických satelitů. Zároveň byl nezbytný pro kolokalizaci těchto satelitů s jadernými tělísky PML. Tvorba komplexu DAXX/ATRX/H3.3/PML byla potvrzena v práci Delbarre et al. [116], v níž autoři pomocí kvantitativní fluorescenční mikroskopie dále popsali model tvorby těchto komplexů. Dle něj jsou nejdříve v jádře formovány komplexy histonu H3.3, H4 a chaperonu DAXX. Po jejich translokaci do tělísek PML dochází buď k vazbě ATRX (a tedy tvorbě plně funkčního komplexu schopného dále ukládat H3.3 do chromatinu) nebo k uvolnění H3.3 a jeho akumulaci v tělískách PML (zde tedy DAXX funguje k vychytávání volného H3.3 z nukleoplazmy). Funkce chaperonu DAXX se však neomezuje pouze na tvorbu nukleozomů. Skupina P.Salomonioho [84] popsala jako první přímý vliv histon-chaperonové funkce DAXX na regulaci transkripce. V depolarizovaných neuronech pozorovali calcineurinem zprostředkovanou defosforylaci S669 v proteinu DAXX. Takto defosforylovaný DAXX měl výrazně vyšší afinitu k H3.3, což mělo za následek ukládání H3.3 do regulačních oblastí některých neuronově specifických genů a jejich zvýšené transkripci.

V roce 2012 byly publikovány dvě nezávislé studie věnující se interakci DAXX/H3.3 na molekulární úrovni pomocí dat získaných krystalizací komplexu H3.3 s doménou HBD chaperonu DAXX. Tuto doménu tvoří 7 α -helixů a pro vazbu DAXX na komplex H3.3/H4 jsou esenciální aminokyseliny S220, Y222, F317, R251, R328 a N331. Mutace v jakékoliv z těchto aminokyselin vede k částečné popř. úplné neschopnosti proteinu DAXX vázat H3.3 [76];[77]; [78].

²⁸ z anglického „embryonic stem cells“ – embryonální kmenové buňky

²⁹ z anglického „neuronal precursor cells“ – prekurzory neuronálních buněk



Obrázek 9: Stručné porovnání histonových chaperonů a jejich funkcí. Upraveno dle MoBiTec GmbH.

2.3.4 DAXX jako regulátor transkripce

Komplex DAXX-HIPK2-AXIN-p53:

Adaptorový protein AXIN byl původně objeven jako jeden z klíčových negativních regulátorů signalizace Wnt, kdy v nestimulovaných buňkách tvoří komplex s proteiny APC a b-kateninem spolu s kinázami GSK3b a CK. [117], [118]. Těmito kinázami fosforylovaný b-katenin je následně degradován v proteasomu. Po stimulaci buněk Wnt ligandem dochází k rozpadu komplexu a stabilizaci β -kateninu. V roce 2004 popsal Rui et al. [119] podobně fungující komplex, jenž je tvořen vedle axinu kinázou HIPK2 a transkripčním faktorem p53. Po ozáření buněk UV světlem dochází k formování komplexu AXIN-HIPK2-p53 a fosforylaci p53 na S43. Fosforylaci p53 na S43 se zvyšuje jeho stabilita a transkripce proapoptických genů (např. *BAX*, *PIG3*) [120]. Stejná skupina později identifikovala DAXX jako další komponentu tohoto komplexu [121].

Komplex DAXX-HDAC/HAT:

DAXX byl identifikován i v komplexech s histon deacetylásami (HDAC1, 2 a 3). Současný model předpokládá, že k represi přepisu některých genů je nezbytná jeho relokace z tělísek PML a následná vazba na regulační oblasti genů spolu s HDAC. Důležitou roli při vyvazování z PML hraje pravděpodobně kináza HIPK [83], [122]). Zatímco v těchto prvních studiích byla aktivace/represe transkripce měřena pouze použitím arteficiálních reporterů (např. luciferázových), později byl tento model ověřen i za fyziologických podmínek. V roce 2005 [80] bylo ukázáno, že po SUMOylaci transkripčního faktoru CBP dochází k vazbě komplexu DAXX/HDAC2 na CBP a následnému snížení transkripce genů kontrolovaných tímto transkripčním faktorem. Podobný komplex – DAXX/HDAC1 – je také zodpovědný za tlumení exprese IL-6³⁰ v myších makrofázích po stimulaci LPS³¹ [123].

Komplex DAXX-DNMT

Vedle (de)acetylace histonů je další epigenetickou modifikací, na níž se DAXX podílí, metylace DNA. Prvními geny, u nichž byla prokázána represe transkripce komplexem DAXX/DNMT1, byly geny kontrolované transkripčním faktorem RelB, a to např. antiapoptotické geny *cIAP1*, *cIAP2* a *c-FLIP* nebo pozitivní regulátory autofágie *DAPK1* a *DAPK2* [124], [125]. Pro tuto represivní funkci je nezbytná fosforylace DAXX na aminokyselinách S737 a S739 v oblasti C-koncové domény SIM [126]. Rozsáhlá studie z roku 2015 [127] využila metodu exomového sekvenování ke zjištění vlivu snížené exprese DAXX na transkriptom buněk PC3³². K/D³³ snížení proteinu DAXX vedlo k signifikantnímu nárůstu exprese cca 2700 genů³⁴. Ačkoliv represe pouze malé části těchto genů byla závislá na DNMT1, následná CHIP-Seq analýza odhalila, že u většiny z nich je nezbytná přítomnost proteinu DAXX pro lokalizaci DNMT1 na chromatin. Clusterová analýza pak ukázala, že komplex DAXX/DNMT1 mj. reprimuje expresi velké části pozitivních regulátorů autofágie. Vedle již dříve popsaných genů *dapk1* a *dapk2* to byly např. *atg3*, *atg8*, *beclin1*, *LC20* a další. Stejná skupina ve své následující studii využila xenotransplantace buněk linií lidských nádorů prostaty do myši [128]. Ukázalo se, že snížení DAXX vede ke nárůstu autofágie a výrazně snížené proliferaci buněk a jejich schopnosti tvořit nádory v athymických myších. Autoři zároveň doplnili experimentální výsledky analýzou údajů z databáze Oncomine. Nadprodukce DAXX byla spjatá s maligní transformací některých rakovin slinivky a prostaty.

Vedle endogenních buněčných genů jsou komplexem DAXX/DNMT1 také metylovány oblasti LTR některých retrovirů (viz podkapitola 2.3.5). Komplex DAXX/DNMT1 je také cílem některých

³⁰ interleukin 6

³¹ LPS - lipopolysacharid

³² buněčná linie PC3 je odvozená z rakoviny prostaty

³³ použity byly dvě různé shRNA proti *DAXX*

³⁴ a zároveň přibližně 2400 genů bylo sníženo

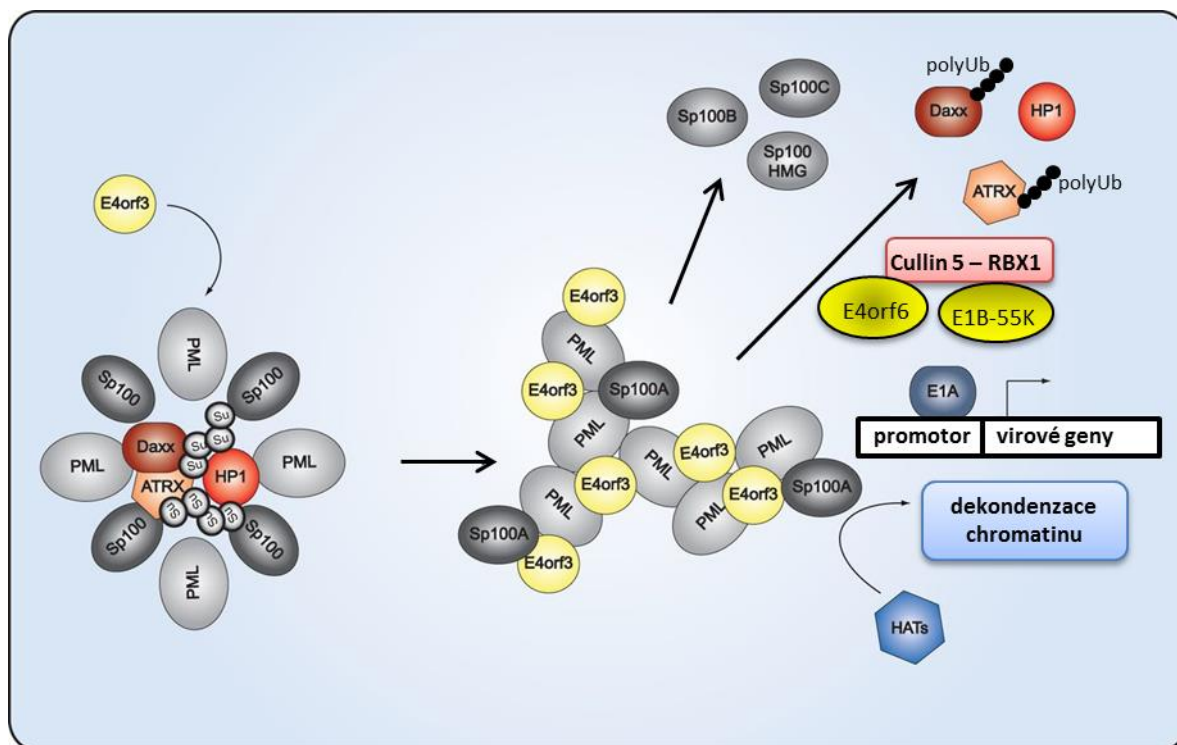
virových kmenů chřipky. Matrixový protein M1 rozvolňuje tento komplex, což má za následek snížení metylace a zvýšení transkripce antiapoptotických genů *c-iap1*, *c-iap2*, nebo *c-flip* [129].

2.3.5 DAXX a antivirová obrana

Obranná funkce DAXX proti virům spočívá v aktivaci endogenních antiapoptotických genů popř. v represi transkripce genů samotného viru. U některých virů jsou pak známé i mechanismy, kterými viry represi zabraňují.

Úloha DAXX při infekci adenoviry

Obranná funkce DAXX při infekci adenoviry spočívá v represi transkripce virových genů v tělískách PML, kde je DAXX v komplexu s ATRX. Zatímco tělíska PML jsou za normálních okolností místem transkripční represe, adenoviry jsou schopné přetransformovat tyto struktury na efektivní místo transkripce potřebných genů. Jednak vyvazují s tělísek transkripčně-inhibiční izoformy proteinu SP100 (izoforma B a C), zatímco transkripčně-aktivační izoforma SP100A v tělískách zůstává. Dále pak adenovirální proteiny E1B-55K a E4orf6 pomocí endogenního ubikvitin-ligázového komplexu Cullin5-Rbx1 ubikvitinylují DAXX a ATRX, které jsou následně degradovány v proteasomu [130]; [131]; [132]; [133]; [134]. Obrázek 10 pak shrnuje model modulace tělísek PML adenoviry.



Obrázek 10: Modulace funkce tělísek PML adenovirálními proteiny. V neinfikovaných buňkách jsou transkripční aktivátory (SP100A) a represory (SP100B+C, SP100HMG, DAXX, HP1) koncentrovány v tělískách PML a ve vzájemné rovnováze. Po infekci adenovirem dochází účinkem virového proteinu E4orf3 k reorganizaci tělísek PML a vyvázání

transkripčních represorů. Z tělísek se tak stávají díky nadbytku aktivátoru SP100A místa aktivní transkripce virových genů. Další dva adenovirální proteiny se také podílejí na ubikvitinylaci a následné degradaci proteinů DAXX a ATRX. Upraveno [135].

Úloha DAXX při infekci cytomegalovirem

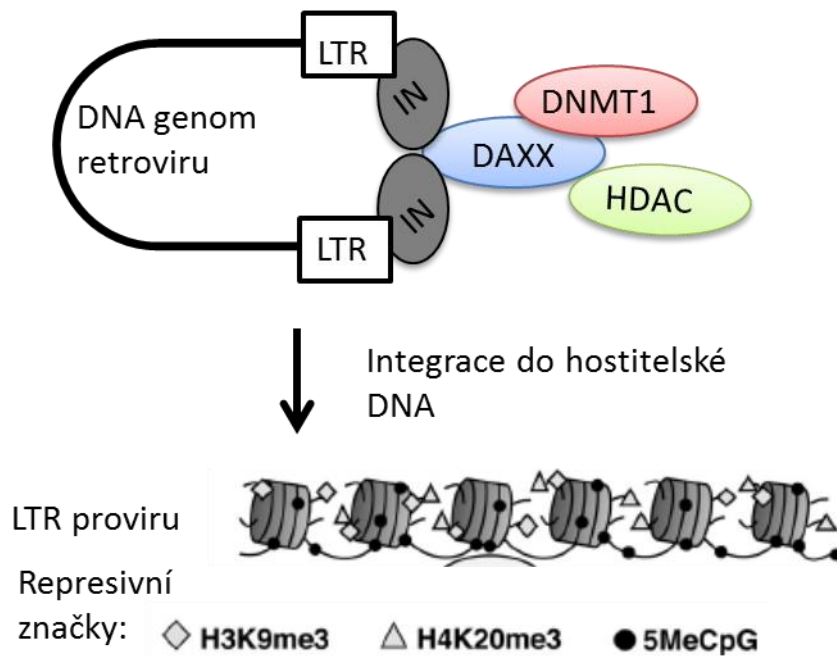
Po infekci CMV dochází nejdříve k transkripci tzv. IE genů³⁵ a replikaci virové DNA. První objevenou funkcí DAXX v obraně proti infekci cytomegalovirem byla deacetylace histonů v oblasti virové DNA komplexem DAXX/HDAC. Tento komplex je během časně fáze infekce rozvolňován virovým matrixovým proteinem pp71. Následná degradace DAXX v proteasomu vede ke zvýšení/derepresi přepisu IE genů. Podobně jako v předchozím případě adenovirové infekce byla molekulární podstata této represe více objasněna po objevu histon-chaperonové aktivity ATRX/DAXX. V roce 2013 ukázáno, že do promotoru CMV ukládá komplex ATRX/DAXX histon H3.3, což vede k represi transkripce. I tento komplex je rozvolňován virovým pp71 a DAXX následně degradován [136]; [137]; [138]; [139]; [140]; [141]; [142]. Doposud však nebyl dokázáno, zda-li je HDAC součástí histon-chaperonového komplexu DAXX/ATRX nebo se jedná o dva nezávislé antivirové mechanismy.

Úloha DAXX při retrovirové infekci:

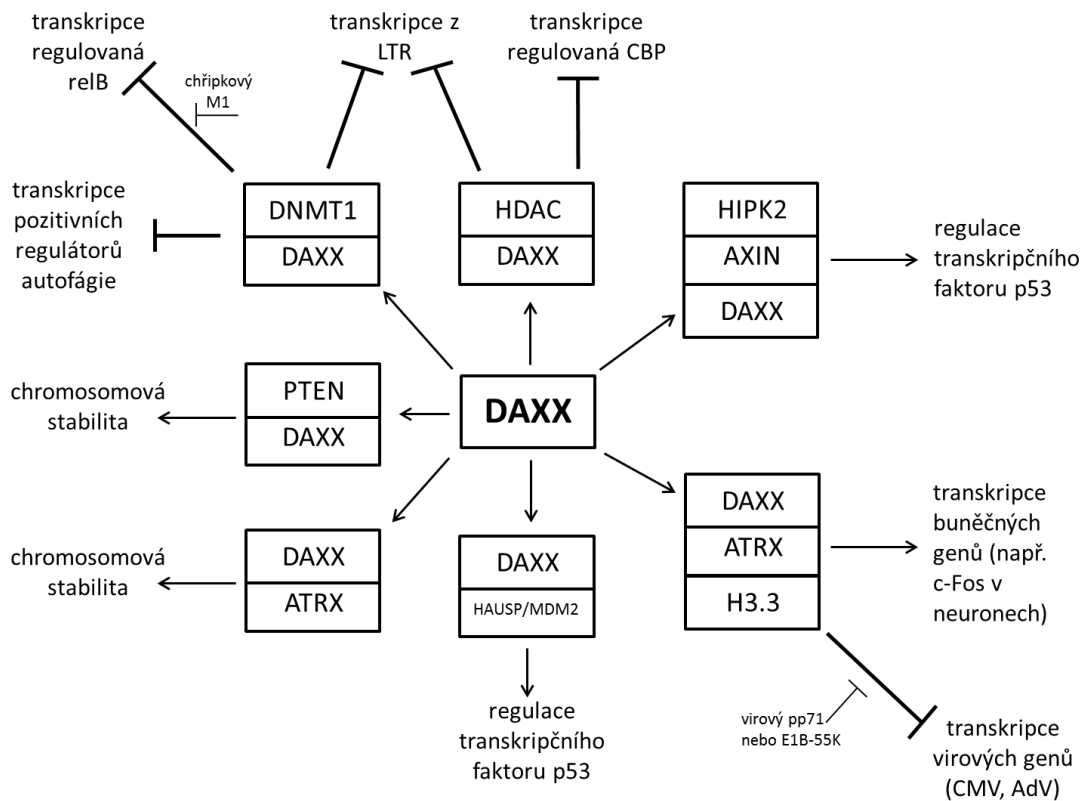
Po infekci retrovirem se DAXX váže na integrázu a dostává se tak do místa integrace budoucího proviru. Zde v komplexech DAXX/HDAC a DAXX/DNMT1 epigeneticky moduluje oblasti retrovirových LTR, a to inhibiční deacetylací histonů či metylací úseků CpG [143]; [144]; [145]; [146]. Navržený model úlohy DAXX v antiretrovirové obraně - Obrázek 11.

Obecně lze shrnout, že většina doposud popsaný funkcí adaptoru DAXX souvisí s regulací (resp. represí) transkripce - shrnutí viz Obrázek 12. Zajímavostí je, že homozygotní delece genu pro DAXX vede u myši k embryonální letalitě (Obrázek 13). Doposud však nebylo objasněno, zda-li je tato neslučitelnost se životem následkem jedné z těchto funkcí nebo kombinací všech.

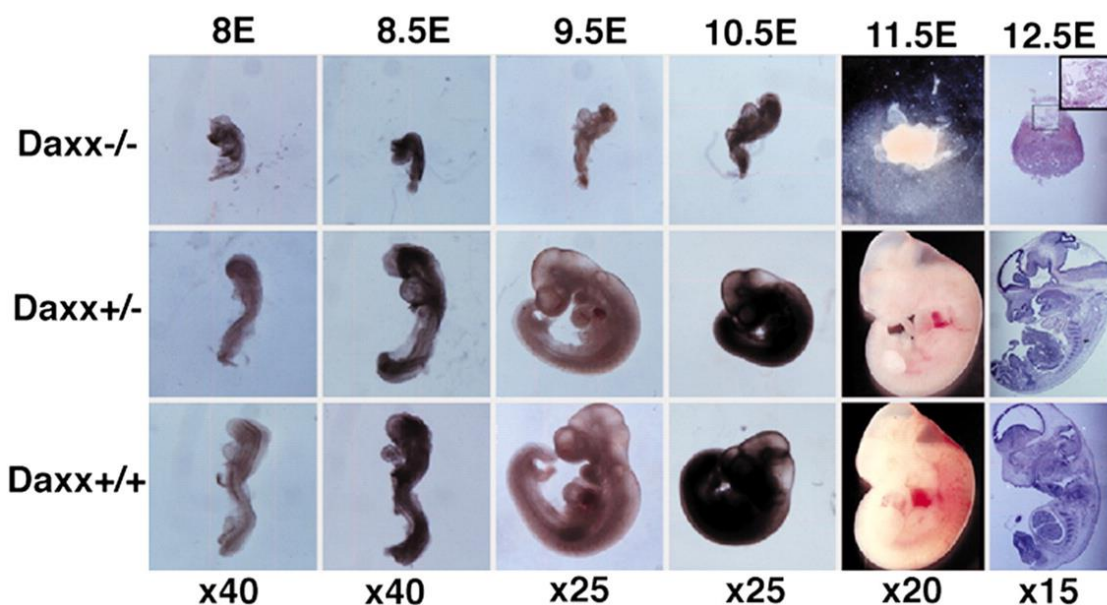
³⁵ z anglického „immediate-early“, jedná se o geny, které jsou přepisovány při virové infekci nejdříve.



Obrázek 11: Model epigenetické regulace retrovirální LTR adaptorovým proteinem DAXX. Po reverzní transkripci se na retrovirovou DNA naváže represivní komplex, který se tak dostane do místa integrace. IN-integráza, LTR-dlouhé repetitivní repetice. Upraveno dle [146].



Obrázek 12: Souhrnné schéma doposud popsaných funkcí adaptoru DAXX.



Obrázek 13: Fenotyp genetické delece *Daxx*. Homozygotní delece genu *Daxx* u myšního embrya vede k vývojové retardaci pozorovatelné od osmého dne. Od desátého dne dochází k postupné dezintegraci embrya. Heterozygotní delece k vývojovým vadám nevede. Zdroj: [102].

2.4 DAXX v nádorové transformaci

První klinickou studií, která poukázala na úzkou souvislost mezi mutacemi *DAXX* a výskytem některých typů rakovin byla práce Jiao et al. [147] analyzující typy a četnost mutací *DAXX* u pacientů s rakovinou slinivky. Zatímco 43% z 68 pacientů se spontánní rakovinou slinivky panNET³⁶ mělo mutaci v genu *DAXX* nebo *ATRX* (popř. v obou), tak mutace těchto genů nebyly detekovány u adenokarcinomu PDAC³⁷ (119 pacientů). U nádoru tohoto typu převládaly naopak mutace v genech *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* nebo v komponentech signální dráhy TGF- β . Na základě těchto výsledků pak Heaphy et al. [148] analyzoval vzorky nádorů 41 pacientů s rakovinou slinivky panNET, kde se zaměřil na přítomnost alternativního prodlužování telomer (ALT)³⁸ a mutace v genech *ATRX* a *DAXX*. Přítomnost ALT byla zjištěna u 60% pacientů. 19 z těchto 21 pacientů pak mělo mutaci v alespoň jednom z genů *ATRX* nebo *DAXX*. Yachida et al. [149] pak porovnal typy a četnost mutací mezi nediferencovaným karcinomem slinivky NEC³⁹ (19 pacientů) a diferencovaným karcinomem panNET (11 pacientů). Zatímco u pacientů s NEC nebyly nalezena mutace v genech *ATRX* nebo *DAXX* (převládaly zde mutace v *TP53* (95%) a *RBI* (74%)), tak u pacientů s panNET byly geny

³⁶ panNET, pancreatic neuroendocrine tumor

³⁷ PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; tj. adenokarcinom vývodu slinivky

³⁸ ve stejné době byla prokázána histon-chaperonová funkce komplexu *ATRX/DAXX* a její vliv na stabilitu telomer (viz podkapitola 2.3.2 a 2.3.3)

³⁹ neuroendocrine cancer

ATRX/DAXX mutovány u 45% (žádný z těchto vzorků však neměl mutaci/abnormální lokalizaci p53 nebo pRB1)⁴⁰. V roce 2012 analyzoval de Wilde et al. [150] primární nádory a metastáze z 28 pacientů s mutací v genu *MEN-1*⁴¹. Ačkoliv ze 108 vzorků mělo mutaci v *DAXX/ATRX* pouze 6%, byly tyto nádory také pozitivní na ALT. Příčinou rozdílu v přítomnosti mutací *DAXX/ATRX* (43% a 45% vs. 6%) mohlo být dle autorů vedle genetického pozadí (sporadický panNET vs. germinální mutace v *MEN-1*) i velikost a stádium nádoru, ze kterého byl odebíráán vzorek. Všechny výše uvedené studie však byly založené na relativně malém počtu vzorků/pacientů. Klinická studie z roku 2014 [151] analyzovala nádory panNET ze 400 pacientů. Vedle výskytu mutací *DAXX/ATRX* a jejich korelace s ALT se zaměřila i na korelaci těchto mutací s celkovou prognózou. Výsledky této studie jednak potvrdily předchozí pozorování a jednak prokázaly pozitivní korelaci mezi přítomností mutací v *DAXX/ATRX* a výrazně kratší dobou života pacientů od stanovení diagnózy.

Vedle nádorů slinivky byly mutace v *ATRX/DAXX* detekovány i v jiných typech nádorů. V klinické studii z roku 2012 [152] mělo ze 49 pacientů s dětským glioblastomem mutaci v *ATRX/DAXX* 31% pacientů. Zajímavostí je, že ze stejného vzorku měl stejný počet pacientů mutaci v genu *H3F3A* (název genu pro variantu histonu H3.3)⁴². I v této studii autoři analyzovali přítomnost ALT – zatímco 30% vzorků s aberantním *ATRX* bylo zároveň pozitivních na ALT, tak 58% vzorků s pozitivním *ATRX* přítomnost ALT nevykazovalo. V roce 2015 [153] byla pozitivní korelace mezi mutacemi *ATRX/DAXX* a ALT prokázána u některých typů liposarkomů, kdy 83% nádorů pozitivních na ALT neslo mutací/delecí v genech *ATRX/DAXX*.

Zcela odlišná funkce proteinu *DAXX* v tumorigenezi je pak asociována s některými nádory prostaty [127]; [128] (viz začátek podkapitoly 2.3.4), kde se *DAXX* jeví naopak jako onkogen.

⁴⁰ zbývajících 55% vzorků s panNET mělo mutace v *SMAD4*, *PTEN*, nebo nadprodukovaný Bcl2.

⁴¹ mutace v tomto genu vede u lidí ke zvýšené incidenci vzniku panNET.

⁴² nejednalo se o úplný překryv, současnou mutaci v *ATRX/DAXX* a v H3.3 mělo 8 pacientů.

3 Cíle práce

- Analyzovat a charakterizovat vliv dvojřetězcových zlomů DNA na adaptorový protein DAXX
- Identifikovat a funkčně charakterizovat posttranslační modifikace DAXX indukované dvojřetězcovými zlomy DNA
- Analyzovat vliv proteinu DAXX na transkripci aktivovanou nádorovým supresorem p53 a dalšími vybranými transkripčními faktory

4 Použitý materiál a metodika

Imunoprecipitace a Western blot

Buňky pro WB analýzu byly lyzovány v 1x Laemmliho pufru bez redukčního činidla a bromfenolové modři. Lyzát byl sonikován a centrifugován. Koncentrace byla stanovena BCA metodou dle pokynů výrobce (Pierce). K lyzátu byl přidán DTT (výsledná koncentrace 33 mM) s bromfenolovou modří (0,01%) a vařen 5 minut. Buňky pro IP byly resuspendovány v lyzačním IP pufru s inhibitory proteáz a fosfatáz (Roche) a následně sonikovány a centrifugovány. Buněčný extrakt byl inkubován s anti-FLAG M2 kuličkami (Sigma Aldrich) 2 hodiny při 4°C. Kuličky s navázanými proteiny byly třikrát omyty v IP pufru a 5 minut vařeny v 2x Laemmli pufru. Eluované proteiny byly po rozdělení na SDS PAGE přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (Hybond ECL 0.45 uM; Amersham) za použití Trans-Blot SD Cell (Biorad) a blotovacího pufru. Membrány byly po zablokování (5% odtučněné mléko v PBS/T20) inkubovány s primárními (přes noc, 4°C) a následně sekundárními protilátkami konjugované s křenovou peroxidázou (60 minut, pokojová teplota). K detekci aktivity křenové peroxidázy (HRP) byl použit ECL substrát (Amersham, Advansta). Složení použitých pufrů je uvedeno níže (Tabulka 1).

název pufru	složení
lyzační IP pufr	50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,5% NP40; 1 mM EDTA
elektrodotový pufr	25 mM Tris; 192 mM glycin; 0,1% SDS
blotovací pufr	25 mM Tris; 192 mM glycin; 20% metanol
Laemmliho pufr	100 mM Tris pH 6,8; 4% SDS; 12% glycerol
hybridizační pufr	10 mM Tris pH 7,5-8; 50 mM NaCl, 1mM DTT
PBS/T20	0,1% Tween 20 v PBS 1x
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄

Tabulka 1: Složení pufrů.

Protilátky a chemikálie

Protilátky použité pro WB:

Primární protilátky jsou shrnuty v tabulce níže (Tabulka 2). K jejich detekci byly použity sekundární protilátky konjugované s HRP: GAR a GAM (BioRad, 170–6515 a 170–6516), RAG (sc2922, Santa Cruz). K detekci imunoprecipitovaných proteinů byly použity protilátky MAR-HRP a GAM-HRP specifické proti lehkému řetězci imunoglobulinů (211-032-171 a 115-035-174, Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Protilátky použité pro imunofluorescenci:

Pro nepřímou imunofluorescenci proteinů byly použity: myší monoklonální anti-PML (sc-966, Santa Cruz), králičí polyklonální anti-fosfoS564-DAXX (Clonestar Peptide Service), GAM Alexa568 (A11036) a GAR Alexa488 (A11034) (Invitrogen).

rozpoznávaný protein	označení protilátky, výrobce	typ
AKTIN	sc-1615, Santa Cruz	kozí, polyklonální
ATM	ab31842, Abcam	myší, monoklonální
pATM (pS1981)	#4526, Cell Signaling	myší, monoklonální
CtIP	A300-488A, Bethyl	kraličí, polyklonální
DAXX	DAXX-03, Exbio	myší, monoklonální
DAXX	M-112, sc-7152, Santa Cruz	kraličí, polyklonální
DAXX	25C12, #4533, Cell Signaling	kraličí, monoklonální
FLAG M2	F1804, Sigma Aldrich	myší, monoklonální
GAPDH	GTX30666, GeneTex	myší, monoklonální
gH2AX (pS139)	05-636, Millipore	myší, monoklonální
gH2AX (pS139)	#9718, Cell Signaling	kraličí, monoklonální
HAUSP	sc-30164, Santa Cruz	kraličí, polyklonální
pCHK1 (pS317)	#2344, Cell Signaling	kraličí, polyklonální
CHK2	05-649, Millipore	myší, monoklonální
pCHK2 (pT68)	#2661, Cell Signaling	kraličí, polyklonální
MDM2	AB-1, Calbiochem	myší, monoklonální
p(SQ/TQ) ATM/ATR substrate	#2851, Cell Signaling	kraličí, polyklonální
p21	sc-56335, Santa Cruz	myší, monoklonální
p53	DO-1, sc-126, Santa Cruz	myší, monoklonální
p53	FL-393, sc-6243, Santa Cruz	kraličí, polyklonální
p53 (pS15)	#9284, Cell Signaling	kraličí, polyklonální
p53 (pS392)	#9281, Cell Signaling	kraličí, polyklonální
pDAXX (pS564)	Clonestar Peptide Services, výroba na zakázku imunizací peptidem EEESPV(Sp)QLFELE	kraličí, polyklonální
pRPA2 (pS33)	A300-246A, Bethyl	kraličí, polyklonální
pRPA2 (pS4/8)	A300-245A, Bethyl	kraličí, polyklonální
TFIIH	sc-293, Santa Cruz	kraličí, polyklonální
TUBULIN	TU-01, Exbio	myší, monoklonální
WIP1	sc-376257, Santa Cruz	myší, monoklonální
WIP1	sc-20712, Santa Cruz	kraličí, polyklonální

Tabulka 2: Seznam použitých protilátek a jejich výrobců.

Buněčné linie a jejich kultivace

Lidské buněčné linie HEK 293T, MCF7, HeLa a U2OS (Tabulka 3) byly kultivovány v DMEM s přidaným FBS (10%) a penicilinem/streptomycinem (1%). Lidské primární fibroblasty BJ (Tabulka 3) rostly v DMEM se sníženým obsahem glukózy (GlutaMAX low glucose DMEM, Gibco) s 10%

FBS a 1% penicilinem/streptomycinem. Buňky byly pěstovány v termostatu při 37°C v 5% CO₂ atmosféře a 95% vlhkosti. Linie stabilně exprimující DAXX byly připraveny lentivirální transdukcí.

název buněčné linie	původ	zdroj
U2OS	lidský osteosarkom	laboratoř prof. Bartka, Kodaň
HEK 293T17	transformované buňky z ledviny lidského embrya	Clontech, Lenti-X™ 293T Cell Line
MCF7	lidský adenokarcinom prsu	ATCC, HTB-22™
HeLa	lidský karcinom děložního čípku	laboratoř prof. Jana Kováře, Praha
BJ	lidské primární fibroblasty	laboratoř dr. Mistrika, Olomouc

Tabulka 3: Seznam použitých buněčných linií.

Indukce poškození DNA a inhibice PI-3 kináz IV. třídy

K ozařování buněk IR byl použit generátor paprsků X T-200 (Wolf-Medizintechnik). Buňky byly ozařovány tvrdým ionizačním zářením procházejícím přes thoriový filtr při dávkovém příkonu 2 Gy/min. K indukci poškození DNA UV zářením (vlnová délka 254 nm) byl použit ozařovač firmy ULTRA-LUM™ (model CEX 800). Samotné ozařování probíhalo v absenci kultivačního média. Dále byly použity chemické agens poškozující DNA: neocarzinostatin (NCS), hydroxyurea (HU), etoposid (VP16) a camptothecin (CPT) byly zakoupeny u společnosti Sigma Aldrich; inhibitor kinázy DNA-PK (NU-7026) a ATR (VE-821) u Tocris Biosciences, inhibitor ATM (KU-55933) a cykloheximid (CHX) pak u společnosti Calbiochem. Inhibiční a disociační konstanty viz Tabulka 4.

inhibitor	DNA-PK (NU-7026)	ATM (KU-55933)	ATR (VE-821)
IC ₅₀ /K _i *)	IC ₅₀	IC ₅₀	K _i
DNA-PK	0,23 uM	2,5 uM	2,2 uM
PI3K	13 uM	16,6 uM	3,9 uM
ATM	>100 uM	13 nM	16 uM
ATR	>100 uM	>100 uM	13 nM

Tabulka 4: Inhibiční (IC₅₀) nebo disociační (K_i) konstanty inhibitorů. *) Jedná se hodnoty změřené v bezbuněčném systému převzaté od výrobců daných inhibitorů.

Příprava buněk U2OS DAXX^{-/-}

Vektor H6578 exprimující dimer nukleázy TALEN byl zakoupen u TALEN Library Resource (Seoul National University). Nukleázy štěpily v okolí sekvence ACTGTTCTCAAG nacházející se v třetím exonu. Buňky U2OS byly transfekovány vektory H6578 a vysety na dvě 96-jamkové destičky pro klonální selekci. U získaných 150 klonů byla analyzována proteinová exprese pomocí SDS-PAGE a WB. Zároveň bylo porovnáno množství mRNA pomocí qRT-PCR. Tři DAXX^{-/-} klony

(označené 17-7, 17-18 a 17-42) byly osekvenovány a dále rozpěstovány. Jako negativní kontrola byly používány klony 0-4 a 0-18, u nichž nedošlo k žádné deleci v genu.

Použité plasmidy a jejich příprava

cDNA DAXX^{WT} pro plasmid pFLAG-CMV-DAXX^{WT} byla připravena pomocí PCR (primery 620+629; Tabulka 5) a zaklonována do vektoru pFLAG-CMV-5a (Sigma Aldrich) a ověřen sekvenací. Bodové mutace v DAXX (S564A, S707A, S712A, T726; S564E) byly připraveny PCR mutagenézí použitím polymerázy PHUSION (High Fidelity DNA polymeráza, Thermo Scientific) a primerů obsahujících danou mutaci (primery 992-997, 1060 a 1063; viz Tabulka 5). Výsledná reakce byla inkubována s restriční endonukleázou DpnI a transformována do bakterií E.coli (kmen TOP10) pomocí kitu QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent). Lentivirové plasmidy exprimující DAXX (wt i mutované formy) byly připraveny subklonováním do vektoru pCDH-CMV-MCS-EF1-PURO (System Biosciences). Příprava expresních plasmidů pQE81L-Wip1^{WT} a -Wip1^{D314A} (nefunkční fosfatázová aktivita) byla popsána v [154].

Lentivirový konstrukt pLKO.1-shDAXX_06 exprimující vlásenku proti DAXX byl připraven v naší laboratoři subklonací příslušného primeru do prázdného vektoru pLKO.1-PURO (SHC001; Sigma): jednovláknové primery obsahující sense/antisense sekvenci shRNA (primery 1004+1005; Tabulka 5) byly smíchány v hybridizačním pufru (Tab1-pufry) v ekvimolárním poměru (20uM). Mikrozkumavka se směsí byla ponořena do kádinky obsahující cca 2 litry vroucí vody. Během postupného chladnutí lázně vytvořily primery dvouřetězcovou DNA s přesahujícími konci, které byly kompatibilní s prázdným vektorem pLKO.1 naštěpeným restričními enzymy EcoRI a AgeI. Po ligaci a transformaci (kmen TOP10) byly kolonie analyzovány pomocí tzv. „colony PCR“. Stručně: vybrané kolonie byly nejdříve resuspendovány v 20 uL destilované vody. Ze suspenze byl použit 1 uL pro analýzu PCR za použití QuickLoad 2x MasterMix (NEB) dle pokynů výrobce. Sekvence primerů použitých pro amplifikaci jsou v Tabulka 5 (983+1475). Vybrané pozitivní plasmidy byly osekvenovány.

Transfekce

Plasmidová DNA byla do buněčných linií transfekována pomocí FUGENE 6 (Roche), pro transfekci siRNA byl pak použit RNAiMAX (Life Technologies), a to dle pokynů výrobců. Sekvence oligonucleotidů a jejich výrobci jsou uvedeny zde: siDAXX (CAGCCAAGCUCUAUGUCUA, Dharmacon), siWIP1 (CGAAAUGGCUUAAGUCGAA, Dharmacon), siLuciferáza (CGUACGCGGAAUACUUCGA, Microsynth), siNT (kat. číslo 4390843, Ambion), siGAPDH (kat. číslo 4390849, Ambion).

číslo primeru	název primeru	sekvence 5'->3'
620	Daxx_FWD_1_Kozak	GGGAATTCACCATGGCCACCGCTAACAGCAT
629	hDaxx-N_REV_BAMH1	GGGATCCTAGTCAGGGAAGGTATCAG
983	pLKO_sequencing	AAACCCAGGGCTGCCTTGGAAAAG
992	hDaxx_S707A_mut_fwd	CTCCAGCCC GGCTGGCCCAA
993	hDaxx_S707A_mut_rev	TTGGGCCAGCCGGGCTGGAG
994	hDaxx_S712A_mut_fwd	CCATGCACAGCCTCCTCGGC
995	hDaxx_S712A_mut_rev	GCCGAGGAGGCTGTGCATGG
996	hDaxx_T709A_mut_fwd	GCCCGGCTGTCCCAAGCCCC
997	hDaxx_T709A_mut_rev	GGGGCTTGGGACAGCCGGGC
1004	Fw_pLKO_Daxx6	CCGGTGGAGTTGGATCTCTCAGAATTCTCGAG AATTCTGAGAGATCCAACCTCTTTTTG
1005	Rev_pLKO_Daxx6	AATTCAAAAAGGAGTTGGATCTCTCAGAATTC TCGAGAATTCTGAGAGATCCAACCTCCA
1060	DaxxS564A_HindIII_rev	GGGGCAAAGCTTCAATCTCTAGCTCAAAGAG CTGAGCCACAGGGC
1063	DaxxS564E_HindIII_rev	GGGGCAAAGCTTCAATCTCTAGCTCAAAGAG CTGCTCCACAGGGC
1475	U6_Fw (pLKO seq)	AATGGACTATCATATGCTTACCG

Tabulka 5: Seznam a sekvence primerů použitých pro přípravu plasmidů (čísla v prvním sloupci odpovídají číslům databáze laboratoře dr.Anděry).

K produkci lentivirů byla použita kalcium fosfátová transfekce. Buňky HEK 293/T17 byly nasazeny den před transfekcí tak, aby následující den dosáhly 60-70% konfluence. Před samotnou transfekcí bylo vyměněno médium za čerstvé obsahující navíc 25 uM chloroquin (C6628, Sigma Aldrich). DNA byla smíchána v 500 ul 2xBBS pufru: 50 mM BES Bes (Sigma, B6420) pH 6,97; 275 mM NaCl a 1,5 mM Na₂HPO₄. Za mírného vortexování bylo přikapáno 500 ul CaCl₂ (250 mM). Po patnácti minutách inkubace při pokojové teplotě byla směs obsahující viditelnou sraženinu komplexů kalcium-fosfát-DNA přikapána na buňky. Buňky byly inkubovány v termostatu se sníženou koncentrací CO₂ (3%). Po 5-6 hodinách bylo médium odstraněno, misky opláchnuty PBS a přidán čerstvý DMEM.

Příprava lentivirů

V kalcium-fosfátové transfekci (viz výše) byly pakážovací plasmidy psPAX2 (Addgene, plasmid 12260) a pMD2.G (Addgene, plasmid 12259) smíchány spolu s vektorem obsahujícím GOI v ekvimolárním poměru ve výsledném množství 20 ug DNA na jednu Petriho misku (průměr 10 cm). Kondiciované médium obsahující lentivirové částice bylo sklizeno 36 hodin po transfekci a precipitováno roztokem PEG-it dle návodu výrobce (System Biosciences). Precipitované lentiviry byly resuspendovány v PBS a zamrazeny v -80°C. Buňky byly transdukovány ekvimolárním

množstvím partikulí (viz níže) po dobu 24 hodin. Následovala selekce puromycinem (Invitrogen) ve výsledné koncentraci 2 ug/ml po dobu 2-3 dnů, popř. 1 mg/ml G418 (Invitrogen) po dobu 4-5 dní.

Stanovení relativního množství lentivirů

Ke stanovování poměru účinných virových částic mezi různými vzorky lentivirových koncentrátů byl v naší laboratoři sestaven následující protokol. Buňky HeLa byly v 96-jamkové destičce transdukovány o konfluenci cca 40%. K infekci se použilo postupně klesající množství lentiviru, kde výchozích 10 ul původního koncentrátu po předchozí precipitaci bylo postupně ředěno 11x. Druhý den byl pro zastavení buněčného růstu přidán thymidin (Sigma) do výsledné koncentrace 2 mM spolu se selekčním antibiotikem (puromycin, G418). Třetí den bylo médium vyměněno spolu s čerstvým thymidinem a selekčním antibiotikem. Po vyselektování transdukováných buněk byla destička opláchnuta 1x PBS a přidán DMEM s WST-8 (Sigma Aldrich) dle pokynů výrobce. Po zabarvení média byla změřena absorbance při 450 nm. Absorbance byla vynesena v grafu proti objemu lentiviru a získané body pak byly proloženy v programu LabFit⁴³ křivkou invertované hyperboly s rovnicí $x/(A + Bx)$. Porovnáním parametru A byla zjištěn poměr funkčních virových částic mezi jednotlivými vzorky.

Fosfatázový test

Bakterie E. coli (kmen BL21) byly transformovány plasmidem pQE81L-WIP1^{WT} nebo WIP1^{D314A}. Produkovaný 6xHis-WIP1 byl purifikován pomocí Ni-NTA agarózy (Qiagen) [154]. FLAG-DAXX^{WT} byl purifikován z transfekovaných buněk U2OS po šedesátiminutové inkubaci s 10 uM VP16 pomocí agarózových kuliček s imobilizovanou M2 FLAG (Sigma). Po trojnásobném promytí (50 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1 mM EGTA) byly kuličky převedeny do fosfatázového pufru (40 mM HEPES pH 7.4, 100 mM NaCl, 50 mM KCl, 1 mM EGTA) a po dobu 15 minut inkubovány při teplotě 15°C se 100 ng purifikované fosfatázy WIP1^{WT} nebo WIP1^{D314A}. Pro negativní kontrolu byl použit fosfatázový pufr bez MgCl₂ a jako pozitivní kontrola sloužila inkubace s λ-fosfatázou (New England Biolabs).

Izolace RNA a kvantitativní PCR

Pro reverzní transkripci byla použita celková RNA izolovaná z buněk pomocí RNA Blue (TOP Bio). Po odsátí média a přidání příslušného objemu RNA Blue (dle doporučení výrobce) byly buňky inkubovány 5 minut při pokojové teplotě. Lyzát byl poté přenesen do mikrokumavky a smíchán s chloroformem (0,1 ml chloroformu na 0,5 ml RNA Blue), důkladně zvortexován a inkubován na ledu

⁴³ <http://zeus.df.ufcg.edu.br/labfit/index.htm>

po dobu deseti minut. Vzorek byl následně centrifugován 12 000 x g, 10min, 4°C. Horní fáze obsahující RNA byla přenesena do nové mikrozkušavky a smíchána s isopropanolem v poměru 1:1 a chlazená 20 minut v -20°C. Po centrifugaci (12 000 x g, 10min, 4°C) byla vysrážená RNA opláchnuta 75% etanolem, vysušena a rozpuštěna ve vodě (PCR kvalita). 1-2 ug RNA byly reverzně přepsány pomocí transkriptázy RevertAid (Thermo Scientific) ve dvacetimikrolitrové reakci s náhodnými hexamery za přítomnosti inhibitoru RNáz RiboLock (Thermo Scientific) dle pokynů výrobce. Po reverzní transkripci byla každá reakce naředěna vodou (PCR kvalita) do celkového objemu 200 ul. Kvantitativní PCR probíhala v 384-jamkové destičce v přístroji LightCycler 480 (Roche). Objem jedné reakce byl 5 ul: 1ul cDNA, 2,5 ul SYBR Green (Roche) a primery ve výsledné koncentraci 0,5 uM. U primerů byla testována jejich účinnost: cDNA byla naředěna ve dvojkové řadě v rozmezí 1-16x a změřena hodnota CP: do grafu byly vyneseny CP hodnoty proti dekadickému logaritmu ředících konstant a spočítána směrnice. Samotná účinnost E byla vypočítána dle rovnice $E = 10^{[-1/\text{směrnice}]}$. Účinnost primerů se pohybovala v rozmezí 1,9-2,05. Relativní množství mRNA bylo počítáno dle rovnice

$$\text{poměr} = \frac{(2^{\Delta CP(\text{referenční vzorek} - \text{měřený vzorek})} \text{cílového genu})}{(2^{\Delta CP(\text{referenční vzorek} - \text{měřený vzorek})} \text{referenčního genu})}$$

K normalizaci byl použit tzv. průměrný referenční gen složený z alespoň tří různých referenčních genů (*TBP*, *ALAS*, *SDH*, *GAPDH*, *AKTIN*, *RPII*, *HPRT*, *HMBS*, *RPL37a*), jejichž exprese byla vždy minimálně ovlivněna samotným experimentem. Každý experiment byl alespoň třikrát zopakován. Sekvence primerů pro cílové i referenční geny jsou uvedeny v Tabulka 6.

Fluorescenční mikroskopie

Buňky byly vysety do destiček s připravenými kulatými krycími sklíčky o průměru. Po ukončení inkubace za daných experimentálních podmínek bylo odstraněno médium, jamky se sklíčky opláchnuty PBS a fixovány formaldehydem (4% v/v v PBS) 10 minut při pokojové teplotě. Fixované buňky byly dvakrát opláchnuty v PBS a 10 minut permeabilizovány v roztoku Triton-X-100 (0,2% v/v ve vodě). Po opláchnutí byla sklíčka blokována 20 minut fetálním telecím sérem (10% v/v v PBS). Pro následovné barvení byla sklíčka umístěna do vlhké komůrky na parafilm. Po hodinové inkubaci sklíček s primární protilátkou (pokojová teplota) a omytí (3x 5 minut v PBS) byla přidána sekundární protilátka konjugovaná s fluoroforem (60 minut, pokojová teplota). Sklíčka byla opláchnuta PBS (3x 5 minut v PBS) a dvě minuty barvena v DAPI (1mg/ml ve vodě). K montování na podložní skla byl použit VECTASHIELD (Vector Laboratories). Vzorky byly analyzovány na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP5.

gen	Accession number	primer 5'→3'	primer 5'→3'
AKTIN	NM_001101.3	GGCATCCTCACCTGAAGTA	AGGTGTGGTGCCAGATTTTC
ALAS	NM_000688.5	GCGATGTACCCTCCAACACAACC	CCACTGGAAGAGCTGTGTGATGTG
DAXX	NM_001141969.1	TCCCTCTGCATCCCTTCTC	CTTCTGGATCGCATTGTGTG
DRAM1	NM_018370.2	TGTCTGTGCTTCACTAATTTCCA	TCACAGATCGCACTCACTACG
GADD45a	NM_001199741	GAGCTCCTGCTCTTGGAGAC	TGTGGATTTCGTACCAGCAC
GAPDH	NM_002046	CACCACACTGAATCTCCCCT	CCCCTCTTCAAGGGGTCTAC
HMBS	NM_000190	AGCTTGCTCGCATAACAGACG	AGCTCCTTGGTAAACAGGCTT
HPRT	NM_000194	CTCAACTTTAACTGGAAAGAATGTC	TCCTTTTCACCAGCAAGCT
MDM2	NM_002392.5	TCGACCTAAAATGGTTGCAT	GGCAGGGCTTATTCCTTTTC
NOXA	NM_021127	GCTGGGGAGAAACAGTTCAG	AATGTGCTGAGTTGGCACTG
p21	NM_001291549	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATC
p53	NM_000546	GGCCCACTTCACCGTACTAA	TTCACAGATATGGGCCTTGA
PIG3	NM_004881.4	TTCCAGCTGTTACATCTTGTGG	CAGTCCTGCATGGATTAGCA
PTEN	NM_001304717.2	ACCAGGACCAGAGGAAACCT	TCTGCACGCTCTATACTGCAA
PUMA	NM_001127240	TGAGCCAAACGTGACCACTA	GGCTGGCTCAGGGAAGAT
RPII	NM_000937.4	GCACCACGTCCAATGACAT	GTGCGGCTGCTTCATAA
RPL37a	NM_000998.4	AGGAACCACAGTGCCAGATCC	ATTGAAATCAGCCAGCACGC
SDH	NM_004168	AGATTGGCACCTAGTGGCTG	ACAAAGGTAAGTGCCACGCT
SESN2	NM_031459.4	GAGCGGAACCTCAAGGTCTA	AGTGCCTCCAGAAGAGGTTG
TBP	NM_003194.4	TTCGGAGAGTTCTGGGATTG	ATCAGTGCCGTGGTTCGT
TIGAR	NM_020375	ACCAGGTGAAAATGCGTGGA	AGTTGCTTGGAGATCCTTGGG
TUBULIN	NM_006082	TGGAACCCACAGTCATTGATGA	TGATCTCCTGCCAATGGTGTA
WIP1	NM_003620.3	GGGAGTGATGGACTTTGGAA	CAAGATTGTCCATGCTCACC
β2M	NM_004048	AGCGTACTCCAAGATTCAGGTT	ATGATGCTGCTTACATGTCTCGAT

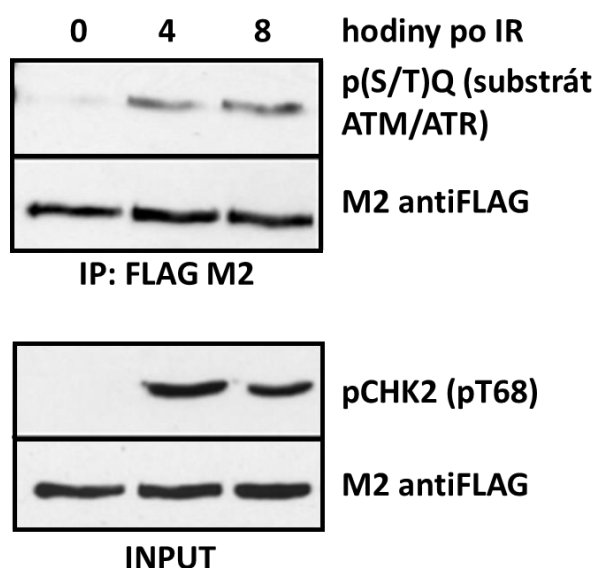
Tabulka 6: Seznam a sekvence primerů použitých pro kvantifikaci mRNA metodou qPCR.

5 Výsledky

5.1 Analýza vlivu poškození DNA na fosforylaci proteinu DAXX

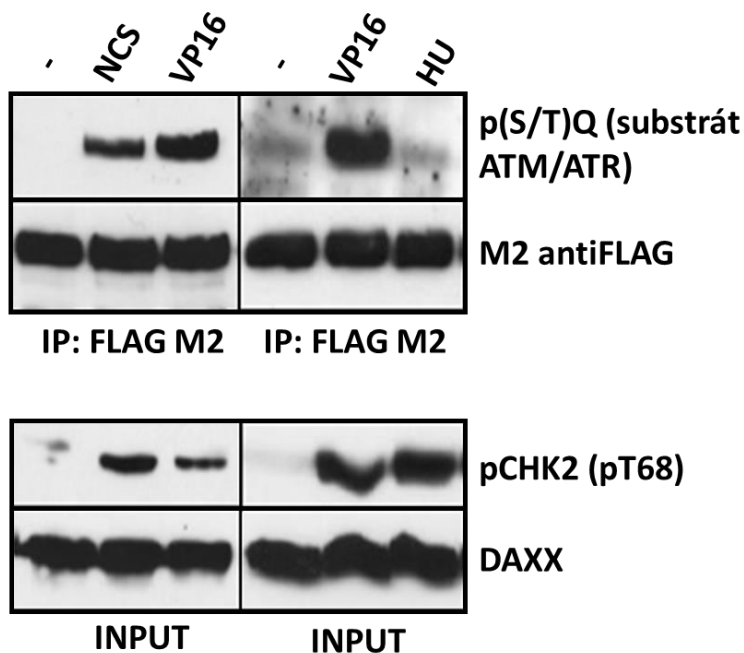
DAXX je extenzivně postranlačně modifikován (SUMOylace, fosforylace) a to např. i v reakci na poškození DNA ionizujícím zářením [1]. V tomto sdělení Matsuoka et al. pomocí SILAC analýzy ozářených a kontrolních buněk HEK293T zjistili, že DAXX je substrátem IV. třídy kináz z rodiny PI3K.

V návaznosti na tento poznatek jsme si v této práci kladli za cíl detailnější analýzu fosforylace proteinu DAXX indukované genotoxickým stresem. V pilotním experimentu transfekovali buňky HEK293T plasmidem pFLAG-CMV-DAXX^{WT} a následující den je ozářili různými dávkami ionizačního záření (IR). FLAG-DAXX^{WT} jsme následně imunoprecipitovali a po separaci na SDS-PAGE ověřili přítomnost fosforylovaného motivu (S/T)Q pomocí specifické protilátky. Signifikantní nárůst fosforylovaného motivu (S/T)Q na imuniprecipitovaném DAXX byl vidět po 4 i 8 hodinách po ozáření (Obrázek 14). Aktivaci dráhy DDR jsme prokázali detekcí fosforylace kinázy CHK2 na T68, která je na tomto threoninu fosforylována po poškození DNA kinázami ATM /ATR [155].



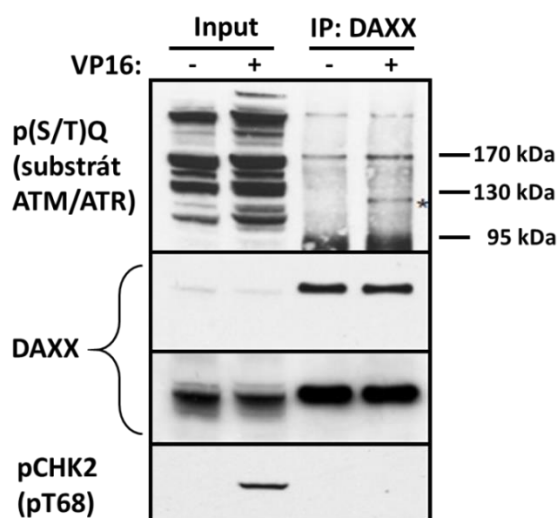
Obrázek 14: DAXX je fosforylován po ionizačním záření. Buňky HEK293T byly transfekovány pFLAG-CMV-DAXX^{WT} a ozářeny IR o dávce 3 Gy. Po 4 a 8 hodinách byl DAXX^{WT} imunoprecipitován protilátkou M2 a fosforylace DAXX a kinázy CHK2 byla detekována pomocí WB protilátkou proti p(S/T)Q motivu (DAXX) či proti pCHK2.

Kromě IR lze DNA poškodit i chemicky např. pomocí induktorů dvojřetězcových (NCS, VP16) či jednořetězcových zlomů (HU). Hodinová inkubace buněk s NCS nebo VP16 vedla i v tomto případě k nárůstu p(S/T)Q fosforylace DAXX (Obrázek 15). K fosforylaci DAXX ale nedocházelo po inkubaci s HU, z čehož vyplývá, že DAXX je fosforylován pouze během buněčné odpovědi na dvouřetězcové zlomy DNA.



Obrázek 15: Fosforylace proteinu DAXX je indukována dvojitřetězovými zlomy DNA. Buňky HEK293T byly transfekovány pFLAG-CMV-DAXX^{WT} a inkubovány s VP16 (40uM, 60 min), NCS (100 ng/ml, 60 min) nebo HU (1mM, 8 hodin). DAXX^{WT} byl imunoprecipitován protilátkou M2 a fosforylovaný motiv detekován pomocí WB protilátkou proti p(S/T)Q motivu.

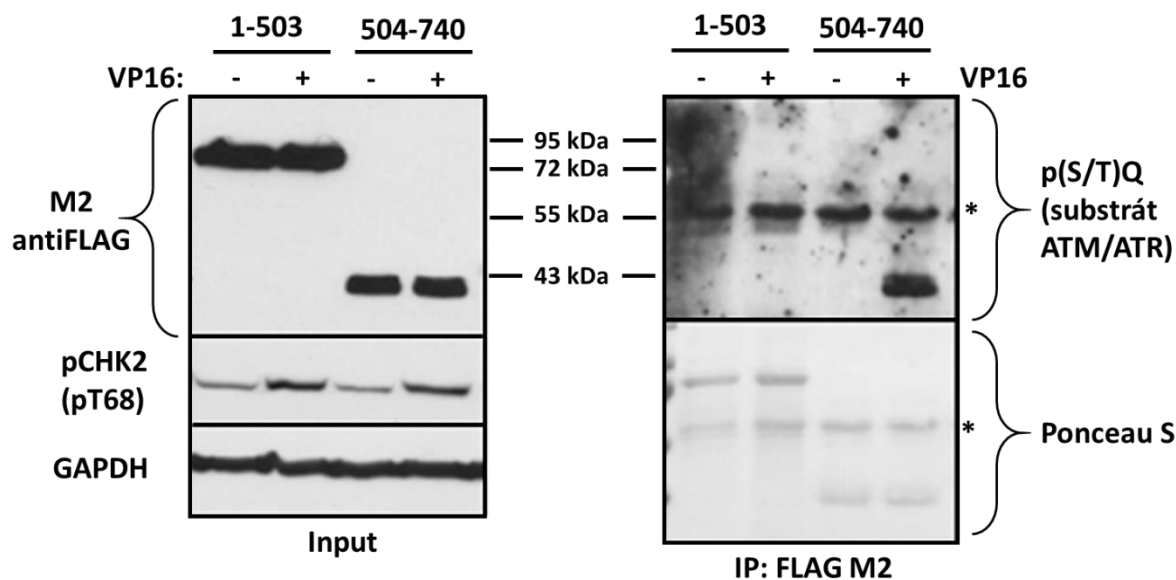
Vzhledem k tomu, že výsledky s uměle nadprodukovanými proteiny mohou být zavádějící, ověřili jsme, že k této fosforylaci DAXX dochází i na endogenní proteinové úrovni. Osteosarkomová linie U2OS byla inkubována s VP16 a imunoprecipitovaný endogenní DAXX byl analyzován na WB. Motiv (S/T)Q byl fosforylován i na molekule endogenního DAXX (Obrázek 16).



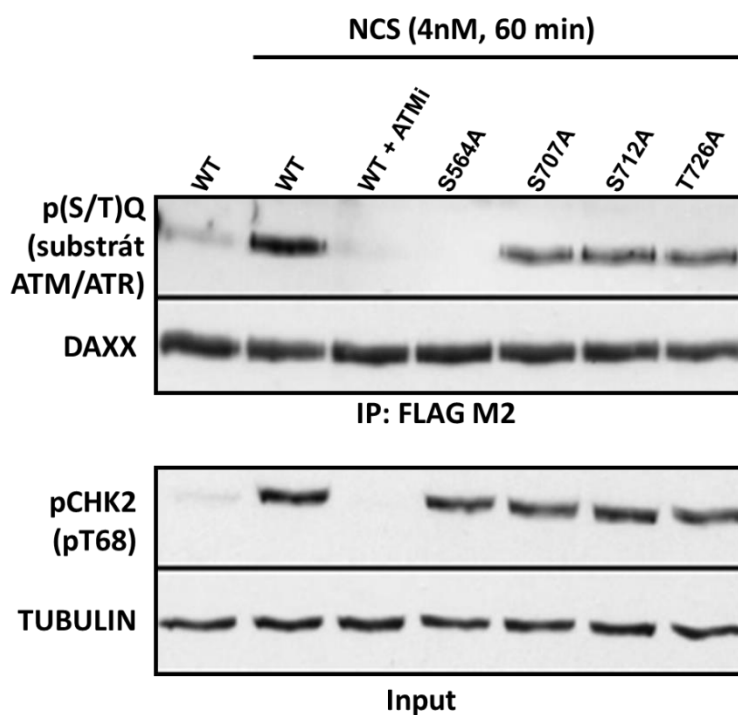
Obrázek 16: Motiv (S/T)Q je fosforylován během DDR i na endogenním proteinu DAXX. Buněčná linie U2OS byla po dobu jedné hodiny inkubována s VP16 (40uM). DAXX byl precipitován pomocí protilátky M112 a po separaci na SDS-PAGE obarven protilátkou proti motivu p(S/T)Q. Hvězdička označuje precipitovaný endogenní DAXX.

5.1.1 Identifikace fosforylovaného motivu DAXX

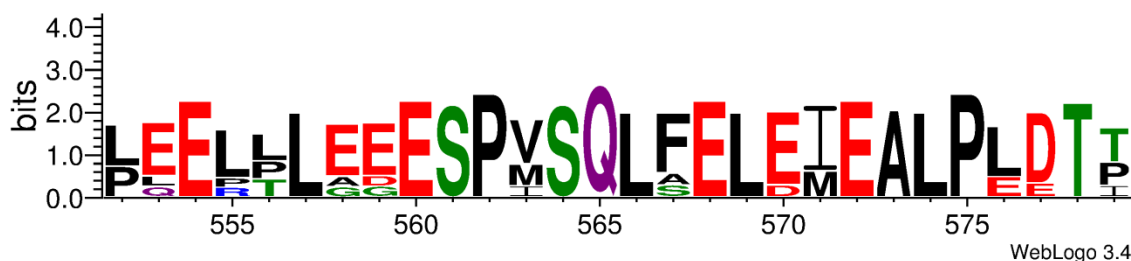
Po ověření fosforylace DAXX jsme se zaměřili na identifikaci fosforylovaného (S/T)Q motivu. Z analýzy aminokyselinové sekvence vyplynulo, že v proteinu DAXX je pět SQ motivů (serin 176, 424, 564, 707 a 712) a jeden TQ motiv (treonin 726). Nejprve jsme připravili dva vektory exprimující C-koncovou nebo N-koncovou část DAXX se značkou FLAG. První konstrukt (aminokyseliny 1-503) obsahoval S176 a S424, zbylé čtyři SQ/TQ motivy se nacházely v druhé části (aminokyseliny 504-740). Oba konstrukty jsme transfekovali do buněk HEK 293T a buňky inkubovali s VP16. Exprimované proteiny imunoprecipitovali protilátkou M2. Fosforylovaný SQ/TQ motiv byl identifikován v části kódované aminokyselinama 504-740 (Obrázek 17). Následovně jsme připravili vektory exprimující DAXX-FLAG s bodovými mutacemi v příslušných aminokyselinách (tedy S564A, S707A, S712A a T726A). Buňky transfekované jednotlivými expresními vektory jsme vystavili genotoxickému stresu a exprimované bodové mutanty DAXX rovněž imunoprecipitovali M2 protilátkou. DAXX-FLAG obsahující bodovou mutaci S564A jako jediný nebyl rozpoznáván protilátkou proti p(SQ/TQ) (Obrázek 18) a tudíž fosforylaci indukované k poškození DNA dochází na serinu 564. Bioinformatická analýza ukázala, že v obratlovcích je tento serin spolu s okolními aminokyselinami velmi konzervovaný (Obrázek 19).



Obrázek 17: Poškození DNA vede k fosforylaci v C-koncové části proteinu DAXX. Buňky HEK 239FT byly transfekovány plasmidy exprimující deleční varianty DAXX. Po inkubaci buněk s VP16 (10uM, 60min) byly části FLAG-DAXX imunoprecipitovány a fosforylované místo detekováno pomocí WB protilátkou proti substrátu motivu p(S/T)Q. Hvězdička označuje těžké řetězce imunoglobulinů.



Obrázek 18: Poškození DNA indukuje v proteinu DAXX fosforylaci serinu 564. Buňky HEK293T byly transfekovány plasmidy exprimující FLAG-DAXX^{WT} nebo jeho variantami s bodovými mutacemi. Po inkubaci s NCS (4nM, 60 min) byl FLAG-DAXX imunoprecipitován protilátkou M2. WB byl barven pomocí uvedených protilátek. ATMi (30 min preinkubace s 10 uM inhibitorem ATM KU-55933).

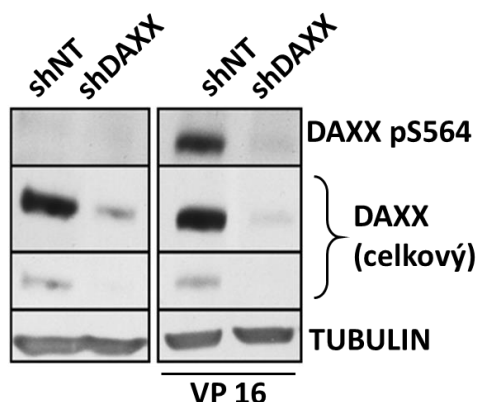


Obrázek 19: Serin 564 je včetně okolních sekvencí konzervovaný mezi obratlovci. Porovnány byly druhy: *Ailuropoda melanoleuca*, *Bos taurus*, *Canis lupus familiaris*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Pan troglodytes*, *Homo sapiens*. Aminokyselinové sekvence v okolí S564 byly porovnány pomocí programu Clustal Omega. Výsledný sekvenční alignment byl importován do generátoru sekvenčních log WebLogo 3. (záporně nabitě aminokyseliny jsou znázorněny červeně, kladně nabitě modře, nepolární černě, neutrální fialově a polární aminokyseliny zeleně).

5.1.2 Příprava a charakterizace anti-fosfo S564 protilátky

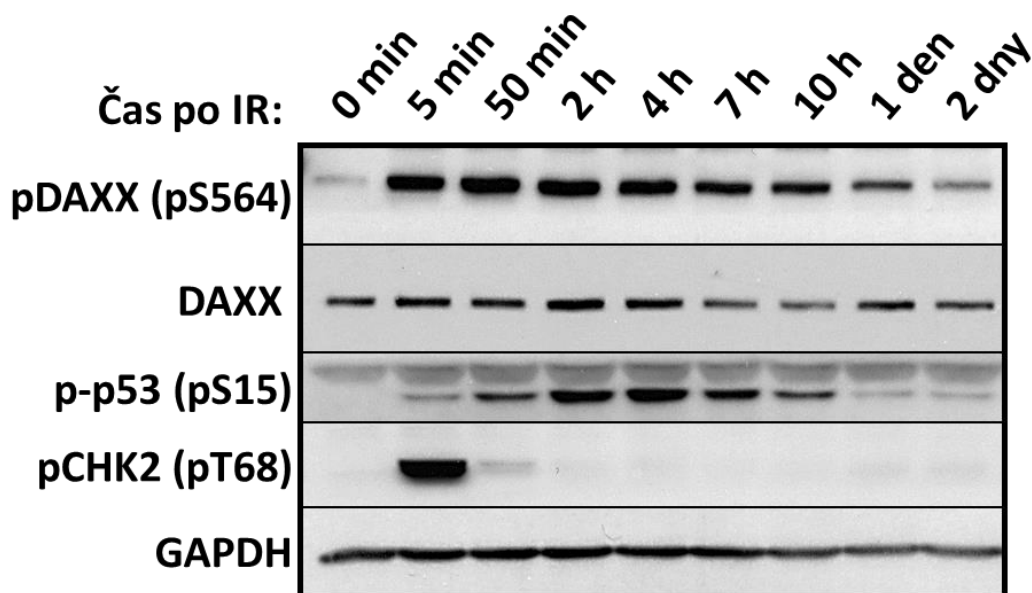
Po přesném zamapování fosforylovaného místa byla pro další studium připravená protilátka specificky rozpoznávající DAXX fosforylovaný na S564. Specificitu této protilátky jsme ověřili pomocí linie U2OS se stabilně sníženou hladinou DAXX. Po hodinové inkubaci buněk s VP16 byl pozitivní signál pouze v buňkách exprimující kontrolní vlásenku, nikoliv však v buňkách se sníženou

hladinou DAXX (Obrázek 20). Dále jsme potvrdili, že protilátka nerozeznává jiný fosforylovaný epitop než pS564. Buňky U2OS stabilně exprimující DAXX^{S564A} nebo DAXX^{WT} byly vystaveny genotoxickému stresu a analyzovány pomocí WB (Obrázek 30).



Obrázek 20: Protilátka pDAXX (pS564) rozeznává DAXX fosforylovaný po poškození DNA. Linie U2OS po transdukci lentivirem exprimovala stabilně kontrolní vlásenku (shNT) nebo vlásenku shDAXX. Po hodinové inkubaci s VP16 (10uM) byly buňky lyzovány a WB analyzován uvedenými protilátkami.

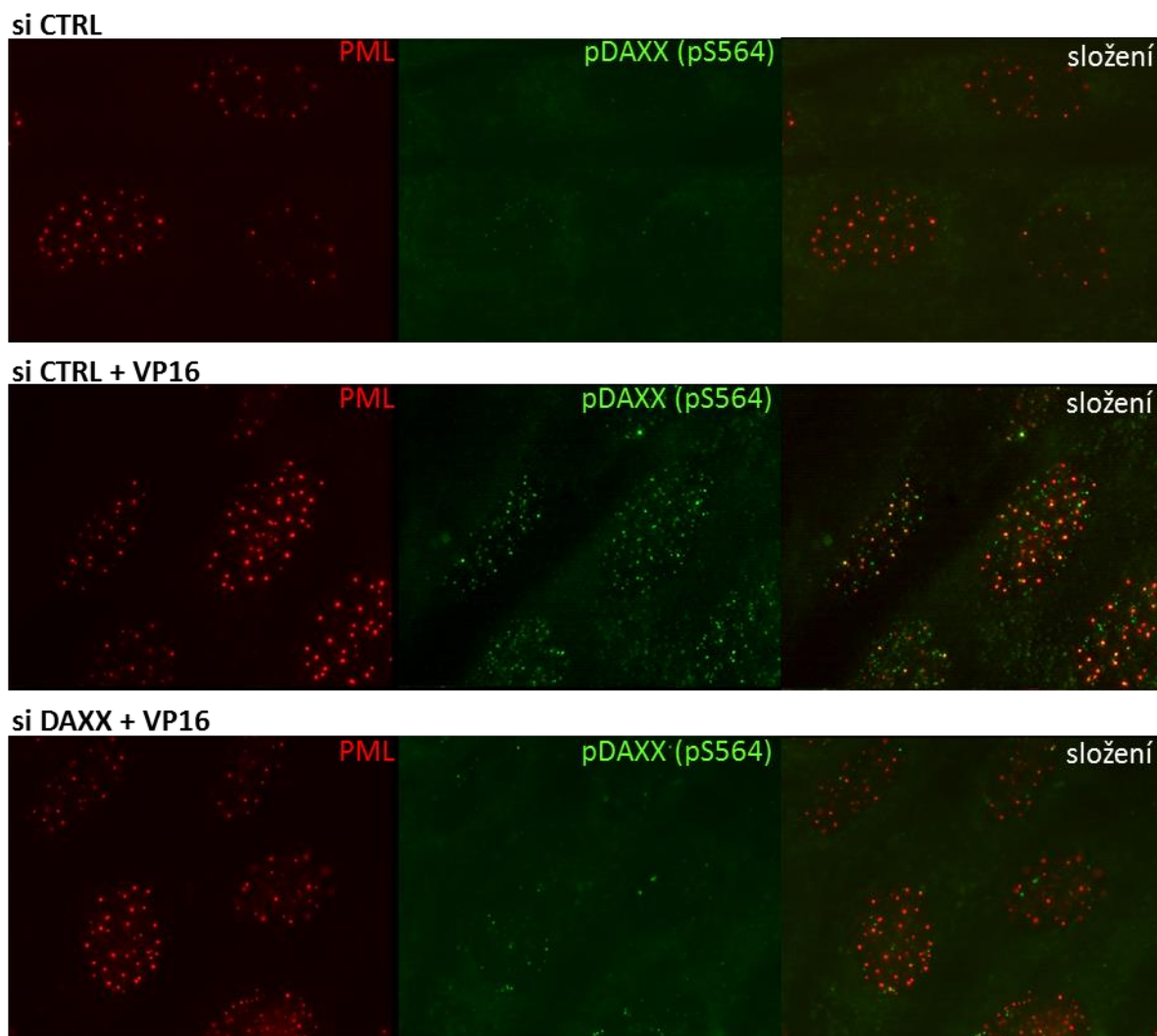
Tato protilátka také umožnila sledovat časovou kinetiku fosforylace S564. K fosforylaci dochází velmi rychle (řádově v minutách), tedy srovnatelně s fosforylací kinázy CHK2. Fosforylace S564 je však poměrně stabilní a DAXX je viditelně fosforylován i 24h po ozáření IR (Obrázek 21).



Obrázek 21: Fosforylace DAXX na S564 po poškození DNA je časně aktivovaná a poměrně stabilní. Primární fibroblasty BJ byly ozářeny IR (10 Gy) a WB byl obarven protilátkami proti fosforylovanému p53, CHK2 a DAXX.

Vzhledem k tomu, že je DAXX převážně jaderný protein, zajímalo nás, zda se po genotoxickém stresu mění jaderná lokalizace fosforylovaného DAXX. Primární fibroblasty BJ byly vystaveny

genotoxickému stresu a nabarveny protilátkou proti PML a pDAXX (pS564). Po hodinové inkubaci buněk s VP16 signál pDAXX kolokalizoval s PML (Obrázek 22).



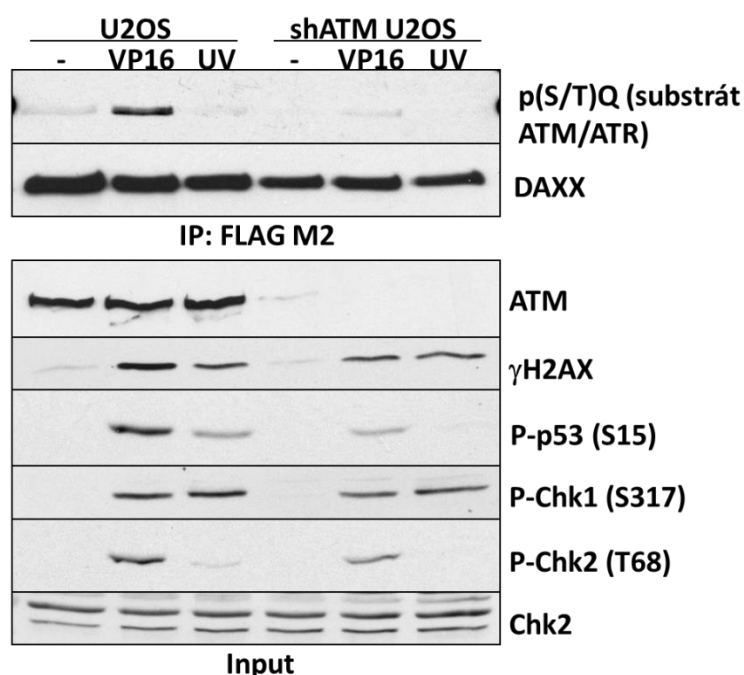
Obrázek 22: DAXX fosforylovaný na S564 převážně kolokalizuje s PML.

Fibroblasty BJ byly transfekovány kontrolní siRNA (siCTRL) nebo siDAXX. Po třech dnech byly buňky inkubovány 60 minut s VP16 (10uM) nebo DMSO a nabarveny protilátkou proti PML (červená) a pDAXX(pS564) (zelená).

5.1.3 Fosforylace DAXX na S564 je závislá na kináze ATM

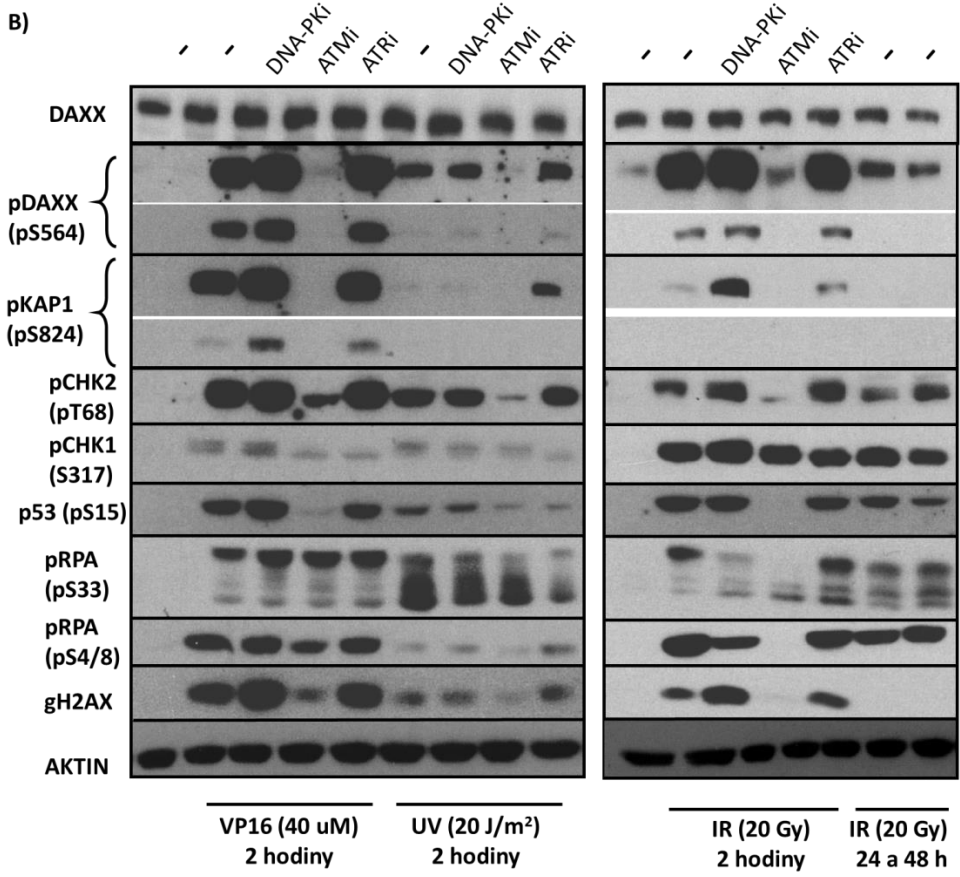
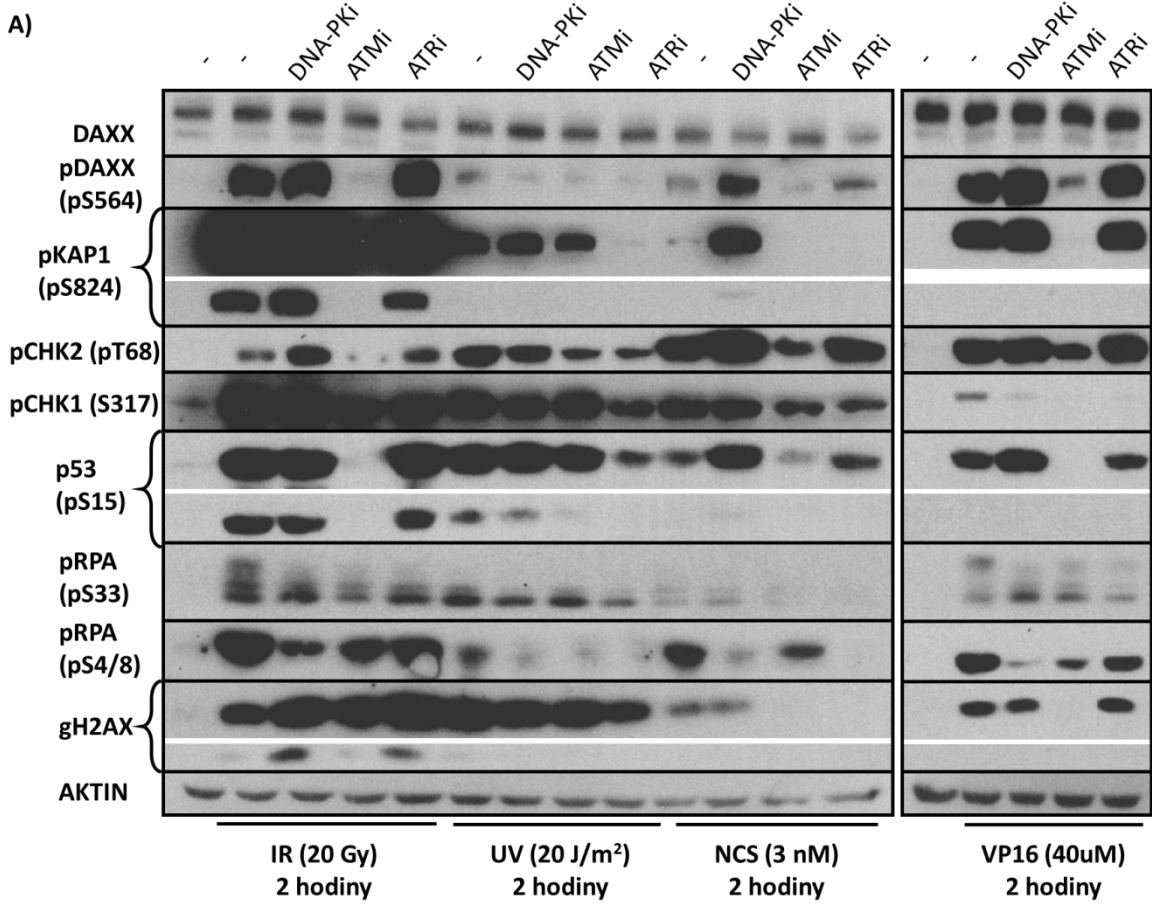
Mezi apikální kinázy spouštějící signální kaskádu DDR patří DNA-PK, ATM a ATR. Jak již bylo uvedeno výše, hlavním rozpoznávaným motivem těchto kináz je dvojice aminokyselin SQ nebo TQ. Některé proteiny mohou být fosforylovány jakoukoliv z těchto kináz (např. CHK2, H2AX, p53), jiné proteiny obsahují motiv rozpoznávaný pouze určitou kinázou (jako např. KAP1 je substrátem pro ATM; protein ARTEMIS pro DNA-PK). Naše dosavadní výsledky implikovaly, že je DAXX fosforylován po dvojřetězcových zlomech (Obrázek 14, Obrázek 15), které aktivují hlavně kinázu ATM a DNA-PK. Také již dříve byl DAXX popsán jako substrát kinázy ATM [1]. Naším dalším záměrem proto bylo zjistit, zda-li je ATM opravdu výlučnou kinázou fosforylující DAXX na S564.

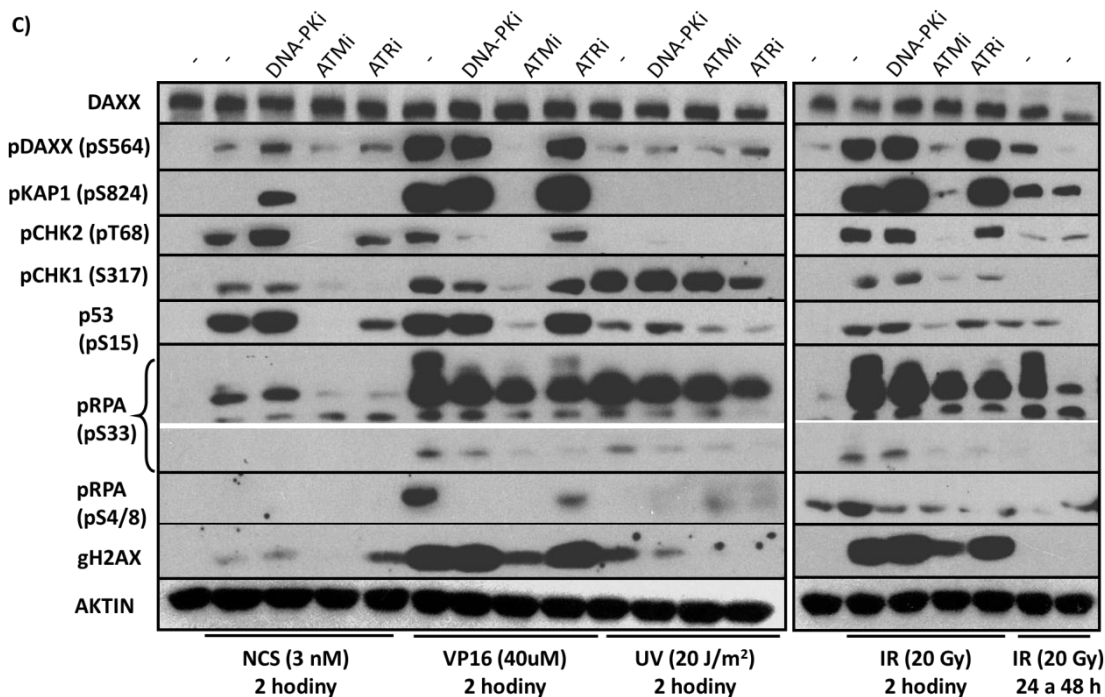
Pro ověření role ATM ve fosforylaci DAXX jsme připravili buněčnou linii U2OS se stabilně sníženou expresí kinázy ATM. V následných experimentech jsme zjistili, že v těchto buňkách byl po poškození DNA imunoprecipitovaný FLAG-DAXX výrazně méně fosforylovaný než v buňkách s normální hladinou ATM (Obrázek 23).



Obrázek 23: Snížení exprese ATM vede ke snížení fosforylace DAXX po DSB. Buněčná linie stabilně exprimující vlásenku shATM byla transfekována FLAG-DAXX^{WT} a následující den inkubována s VP16 (40 uM) nebo vystavena UV záření (20J/m²). Po 60 minutách byl FLAG-DAXX imunoprecipitován a úroveň fosforylací analyzovaných proteinů byla porovnána pomocí WB příslušnými protilátkami.

Dalším přístupem bylo použití specifických inhibitorů proti všem třem apikálním kinázám z rodiny PI3K účastnících se signalizace DDR. Specifita inhibitorů vůči jednotlivým kinázám je shrnuta výše (Tabulka 4). Různé druhy genotoxického stresu způsobují odlišné typy poškození DNA a stejně tak se liší i buněčná odpověď na tento stres. Zvolili jsme proto čtyři typy genotoxických agens: IR, záření UV, NCS a VP16 (viz podkapitola 2.1.4). Zároveň jsme použili tři různé lidské buněčné linie: U2OS (nádorová linie s funkčním p53 často používaná ke studiu DDR), HeLa (nádorová s nefunkčním p53) a BJ (primární fibroblasty). Jako kontrolu funkčnosti inhibitorů a jsme detekovali KAP1 fosforylovaný na S824 (substrát ATM), RPA fosforylovaný na S4/8 (substrát ATM a DNA-PK) a RPA fosforylovaný na S33 (substrát ATR) a dále fosforylaci CHK1 a CHK2 na S317 a T68 (substráty ATM a ATR). Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že jediným inhibitelem snižujícím fosforylaci S564 po genotoxickém stresu byl inhibitor kinázy ATM KU-55933 (Obrázek 24 a-c). Tento inhibitor u všech třech analyzovaných buněčných linií také výrazně potlačoval fosforylaci proteinů KAP1, CHK2, p53 či H2AX indukovanou zejména IR či VP16.



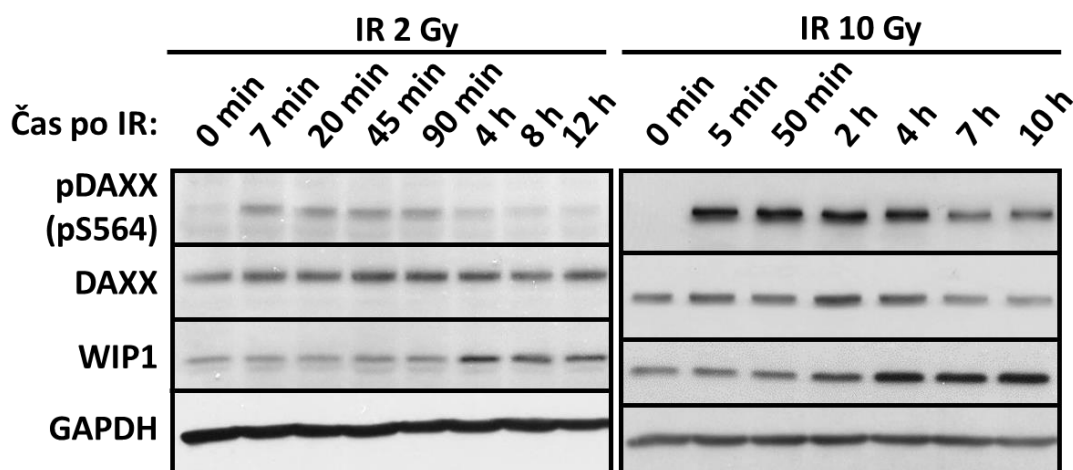


Obrázek 24: Fosforylace DAXX na S564 je závislá výlučně na kináze ATM. Nádorové linie HeLa (A), U2OS (B) a normální lidské fibroblasty BJ (C) byly po hodinové inkubaci s 10 uM inhibitory kináz (DNA-PKi, ATMi nebo ATRi) vystavena genotoxickému stresu. Buňky byly po uvedené době lyzovány a proteiny byly analyzovány pomocí WB uvedenými protilátkami.

5.1 Fosforylace DAXX na S564 je negativně regulována fosfatázou WIP1

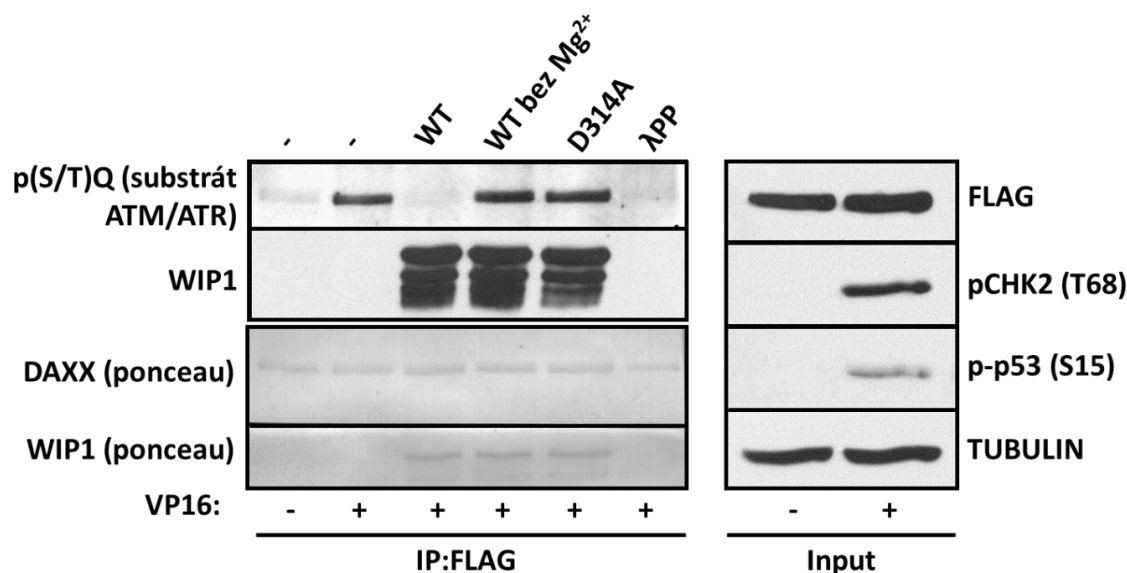
Poškození DNA spouští v buňce sofistikovanou signální kaskádu, jejíž součástí jsou posttranslační modifikace proteinů. Po opravě DNA musí dojít k ukončení této odpovědi, včetně odstranění příslušných PTM, jako jsou fosforylace, ubikvitinylace, PARylace apod. Jedním z hlavních enzymů defosforylující DDR proteiny je fosfatáza WIP1 (alias PPM1D) [62, 156], která defosforyluje zejména p(S/T)Q motiv. Exprese WIP1 je pozitivně regulována transkripčním faktorem p53. Ten je v rámci DDR stabilizován, což vede ke zvýšení exprese WIP1. Zvýšená hladina WIP1 jednak tlumí kaskádu DDR a jednak se významně podílí na ukončení této signalizace po opravě DNA a obnovení buněčného cyklu. Jedná se tak o negativní zpětnou vazbu. V následujících experimentech jsme otestovali, zda-li se fosfatáza WIP1 také podílí na defosforylaci S564 proteinu DAXX.

Nejdříve jsme ozářili pomocí IR fibroblasty BJ a sledovali v čase změnu hladiny WIP1 a fosforylace DAXX na S564. Nárůst hladiny WIP1 patrný již po 4. hodině od ozáření buněk koreloval se poklesem fosforylace DAXX na serinu 564 (Obrázek 25).



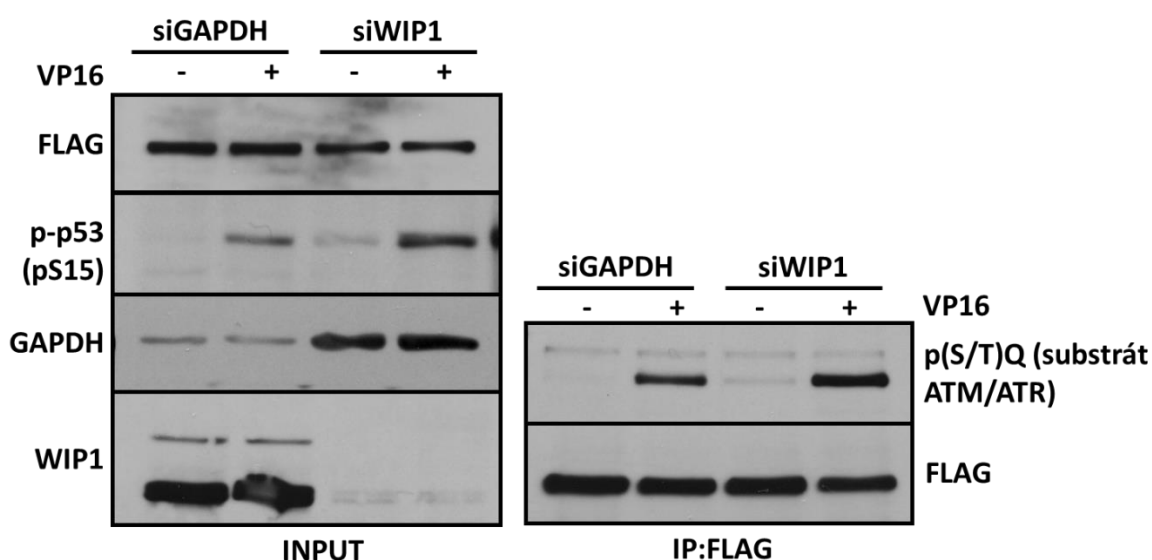
Obrázek 25: Snižování fosforylace S564 proteinu DAXX koreluje časově s nárůstem proteinové hladiny fosfatázy WIP1. Fibroblasty BJ byly ozářeny dávkou 2 nebo 10 Gy. Po iradiaci byly vzorky pro WB postupně odebrány a analyzovány pomocí WB s příslušnými protilátkami.

Defosforylaci S564 pomocí WIP1 jsme si následně ověřili sérií *in vitro* i *in vivo* experimentů. Pro ověření *in vitro* byly buňky U2OS transfekovány FLAG-DAXX a po hodinové inkubaci s VP16 byl imunoprecipitovaný FLAG-DAXX inkubován s rekombinantní fosfatázou HIS-WIP1 (Obrázek 26). Ke snížení fosforylace došlo pouze v přítomnosti WIP1^{WT}, nikoliv však v reakčním pufru bez Mg²⁺ či po inkubaci s WIP1^{D314A} (u které je fosfatázová aktivita WIP1 eliminována bodovou mutací). Pozitivní kontrolou byla defosforylace imunoprecipitovaného fosforylovaného DAXX s bakteriální fosfatázou lambda.

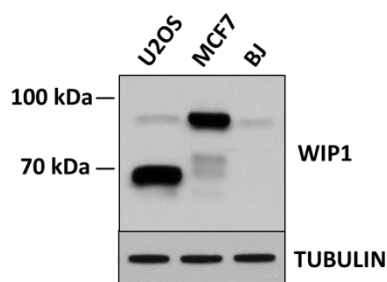


Obrázek 26: WIP1 fosfatáza defosforyluje S564 v proteinu DAXX *in vitro*. Linie U2OS byla transfekována FLAG-DAXX. Následující den byly buňky hodinu inkubovány s VP16 (10uM). FLAG-DAXX byl imunoprecipitován a inkubován s rekombinantními fosfatázami. Změny v úrovni fosforylace byly detekovány na WB použitím protilátky proti motivu p(S/T)Q.

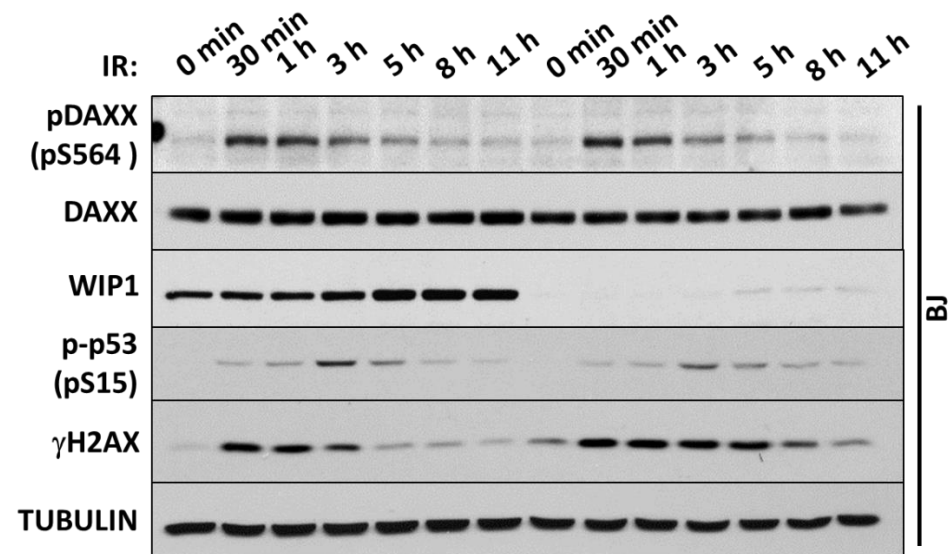
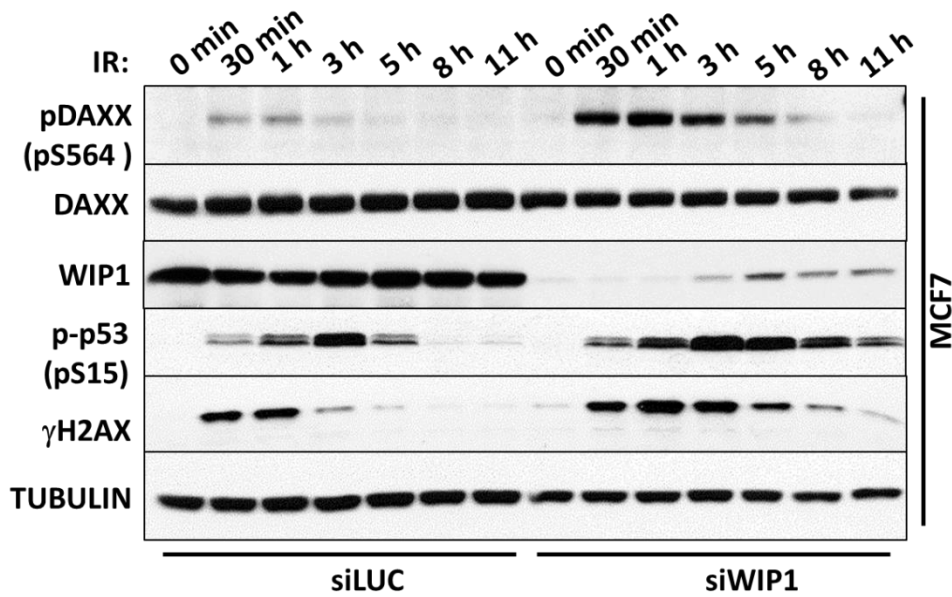
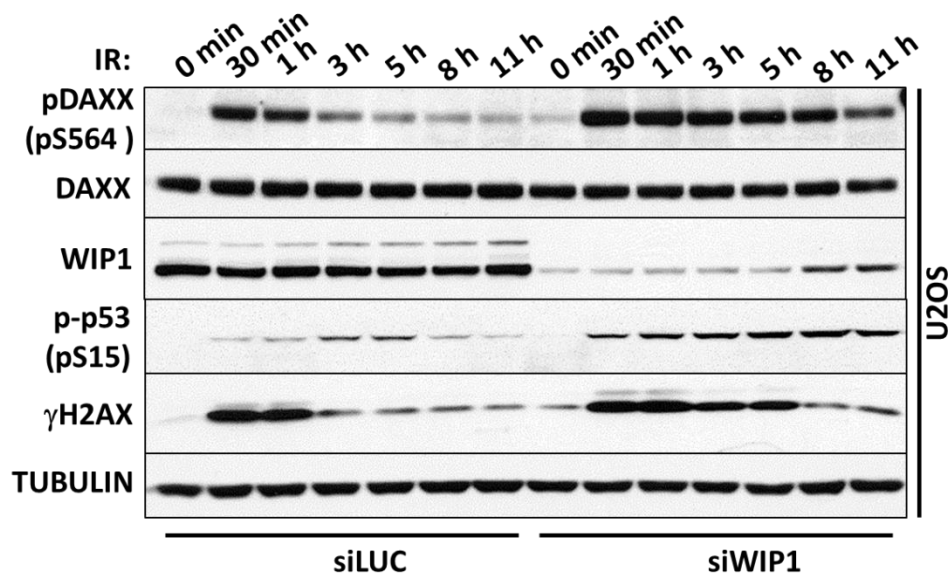
Negativní regulace S564 fosfatázou WIP1 byla také analyzována v buňkách U2OS s pomocí RNA interference potlačenou expresí WIP1. Po inkubaci těchto buněk s VP16 byl z jejich lyzátů imunoprecipitován FLAG-DAXX a pomocí WB byla porovnána úroveň fosforylace S564. V buňkách se sníženým WIP1 byla tato fosforylace významně vyšší (Obrázek 27). V dalším kroku jsme sledovali kinetiku defosforylace pS564 v závislosti na množství WIP1 v delším časovém období a zároveň jsme experimenty rozšířili i na další buněčné linie (MCF7 a BJ). V obou nádorových liniích jsme pozorovali jak zesílení samotné fosforylace S564 tak i její vyšší stabilitu (Obrázek 29). Primární linie BJ exprimuje v porovnání s předchozími liniemi signifikantně nižší množství WIP1 (Obrázek 28) a další snížení této fosfatázy pomocí siRNA mělo na úroveň fosforylace DAXX téměř neznamatelný efekt (Obrázek 29). Souhrně tyto výše uvedené experimentální přístupy potvrdily, že se WIP1 fosfatáza negativně podílí na defosforylaci pS564 proteinu DAXX.



Obrázek 27: Snížení WIP1 vede ke zvýšení fosforylace DAXX na S564. V buněčné linii U2OS stabilně exprimující FLAG-DAXX^{WT} byla snížena exprese WIP1 pomocí siRNA. Po třech dnech byly buňky inkubovány s VP16 (10uM, 1 hodina). FLAG-DAXX byl imunoprecipitován a úroveň fosforylace S564 byla ověřena pomocí protilátky p(S/T)Q.



Obrázek 28: Porovnání proteinové hladiny WIP1 mezi buněčnými liniemi U2OS, MCF7 a BJ. Buněčná linie U2OS obsahuje bodovou mutaci R458X ve *WIP1* genu [157], jenž vede k tvorbě zkrácené a výrazně stabilnější formy WIP1.



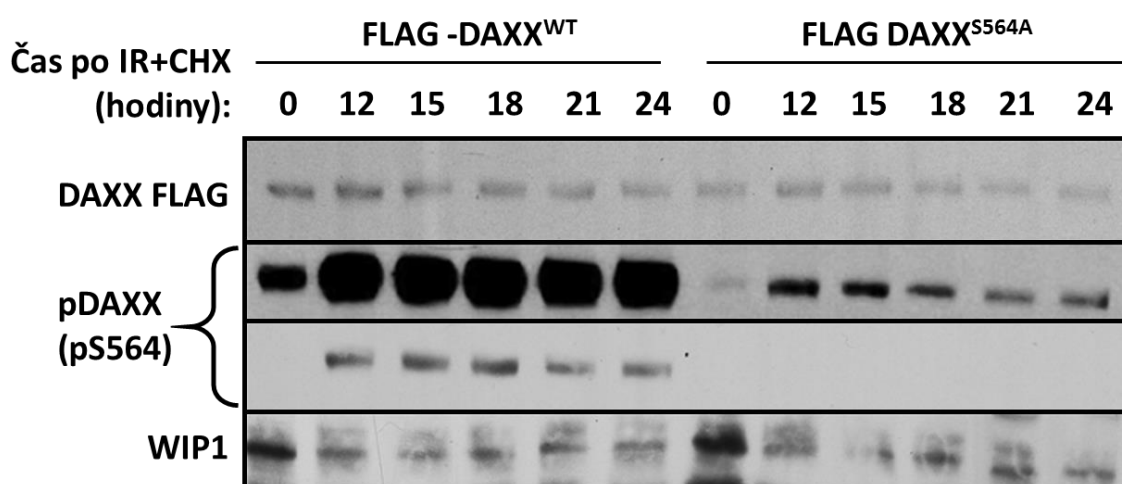
Obrázek 29: (předchozí strana) Snížení exprese WIP1 vede ke zvýšení fosforylace DAXX na S564 po genotoxickém stresu. Buňky U2OS, MCF7 a BJ byly transfekovány siLUC nebo siWIP1 a po třech dnech ozářeny IR (5 Gy). Vzorky pro WB analýzu byly postupně odebírány v následujících jedenácti hodinách po ozáření.

5.2 Funkce fosforylovaného S564 v proteinu DAXX

5.2.1 Fosforylace S564 a její vliv na stabilitu proteinu DAXX

Stabilita některých proteinů účastnících se (nejen) DDR (např. p53, MDM2 nebo cyklinů) je regulována fosforylací spojenou s následnou ubiquitynlací a degradací v proteazomu. Naší první hypotézou tedy bylo, zda-li se fosforylace S564 nepodílí na regulaci proteinové stability proteinu DAXX.

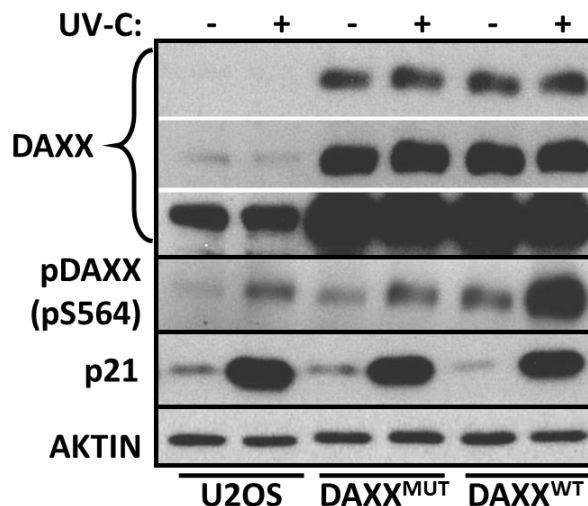
Buňky U2OS byly transdukovány vektory pCDH-FLAG-DAXX^{WT} nebo pCDH-FLAG-DAXX^{S564A} a po příslušné selekci byly buňky vystaveny ionizačnímu záření v přítomnosti inhibitoru translace cykloheximidu. Během následujících 24 hodin po ozáření byly postupně odebírány vzorky pro WB analýzu. Vedle proteinu DAXX byla analyzována i degradace méně stabilní fosfatázy WIP1. Ve sledovaném časovém úseku však nebyl pozorován žádný rozdíl ve stabilitě DAXX^{S564A} vůči DAXX^{WT} a zároveň v souladu s publikovanými daty jsme si ověřili, že DAXX je poměrně stabilní protein - během 24 hodin docházelo jen k jeho minimální degradaci⁴⁴ (Obrázek 30) [158].



Obrázek 30: Fosforylovace S564 neovlivňuje stabilitu/degradaci proteinu DAXX. Buňky U2OS stabilně exprimující FLAG-DAXX byly ozářeny IR (7,5Gy) a dále pěstovány v přítomnosti cykloheximidu (50 uM). Vzorky byly odebírány ve vyznačených časových bodech a analyzovány WB pomocí uvedených protilátek. (pozn.: pozitivní signál pS564 ve vzorcích s nadprodukovaným DAXX^{S564A} pocházel z endogenního DAXX).

⁴⁴ sledování degradace proteinů v delším časovém horizontu nebylo možné, neboť delší inkubace s cykloheximidem vedly k rapidnímu umírání buněk.

Vedle stability proteinu DAXX v odpovědi na IR jsme také analyzovali případnou změnu jeho stability po UV záření. Kitagawa et al. [159] publikoval článek o degradaci DAXX spouštěné zářením UV-C. V našich experimentech jsme fosforylaci S564 po tomto typu poškození DNA viděli pouze v linii U2OS (srov. Obrázek 24B). V buněčné linii U2OS jsme proto stabilně nadprodukovali DAXX^{WT} nebo DAXX^{S564A} a tyto buňky jsme ozářili UV-C. Obdobně jako v případě ozáření buněk IR jsme ale nedetekovali žádné rozdíly v degradaci nadprodukovaných proteinů a oproti publikovaným výsledkům prakticky nedocházelo ani k žádné degradaci endogenního proteinu DAXX (Obrázek 31).

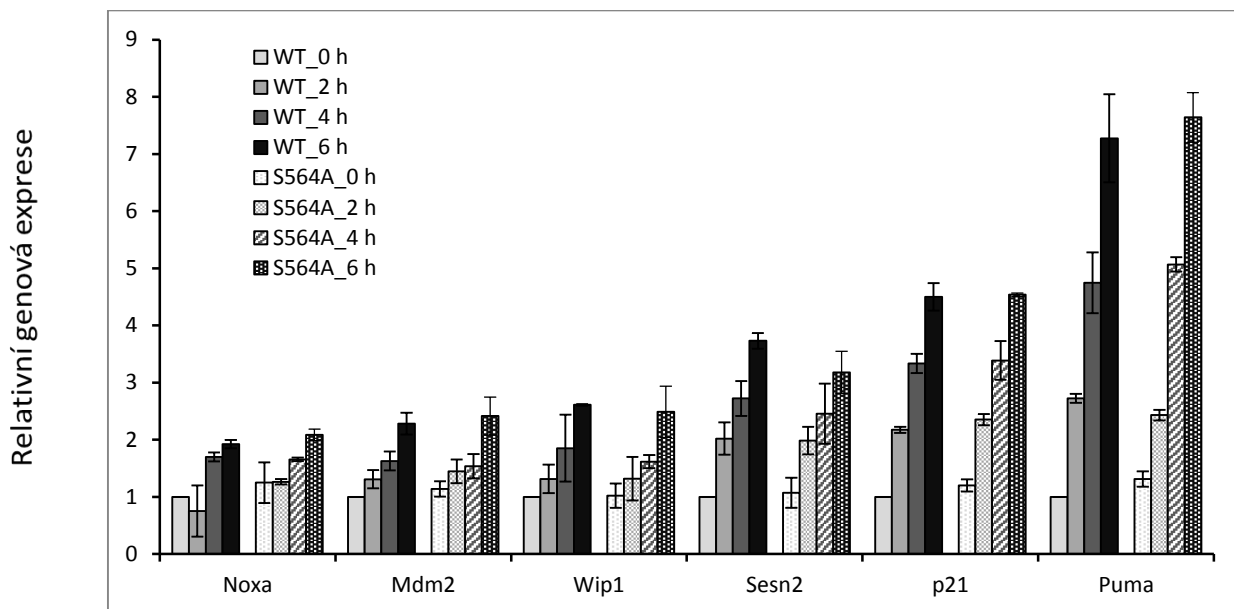


Obrázek 31: Fosforylovace S564 neovlivňuje stabilitu/degradaci proteinu DAXX po UV-C záření. Linie U2OS stabilně exprimující DAXX byla ozářena UV-C lampou (80 J/m²). Po 4 hodinách byly buňky sklizeny, lyzovány a analyzovány WB pomocí uvedených protilátek.

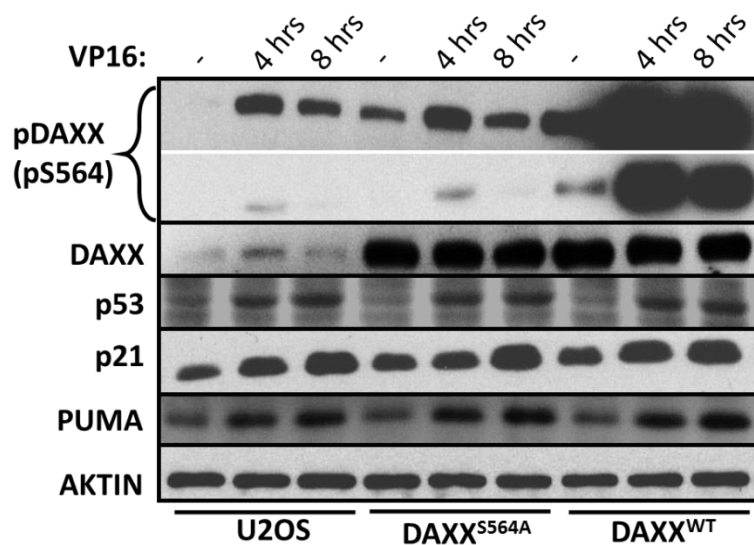
5.2.2 Fosforylace DAXX a její vliv na stabilitu transkripčního faktoru p53

DAXX byl popsán jako klíčový adaptor komplexu MDM2-HAUSP-p53 regulující stabilitu p53. Dle publikovaného modelu se tento komplex rozpadá během odpovědi na genotoxický stres, což vede ke stabilizaci p53 (viz podkapitola 2.1.6) a následnému zvýšení exprese genů regulovaných tímto transkripčním faktorem. Jednou z možných funkcí fosforylovaného S564 proteinu DAXX by mohla být destabilizace tohoto komplexu. Bodová mutace S564A zabráňující fosforylaci by tedy měla vést ke stabilizaci komplexu, nižší hladině p53 a nižší transkripci genů v porovnání s DAXX^{WT}. Připravili jsme linii U2OS stabilně exprimující DAXX^{WT} nebo DAXX^{S564A}. Z buněk jsme po inkubaci s VP16 izolovali RNA a pomocí qPCR porovnali změny v expresi několika genů pozitivně regulovaných p53 (viz podkapitola 2.1.6): *p21*, *MDM2*, *SESN2*, *PUMA*, *NOXA*, *WIP1* a *TIGAR* (Obrázek 32). Exprese všech genů byla po použití VP16 signifikantně zvýšená, nicméně jsme nepozorovali žádný rozdíl mezi linií nadprodukující DAXX^{WT} a DAXX^{S564A}. Zvýšení hladiny proteinů p21 a PUMA jsme také

ověřili pomocí WB. Stejně jako v předchozím případě byla jejich hladina zvýšena ve stejné míře (Obrázek 33). Dle Tang et al. [86] však i samotná nadprodukce DAXX^{WT} měla vést k nižší stabilizaci p53 a tím i nižší expresi p21. My jsme však nepozorovali žádný rozdíl mezi linií nadprodukující DAXX^{WT} a linií transdukovanou prázdným vektorem.



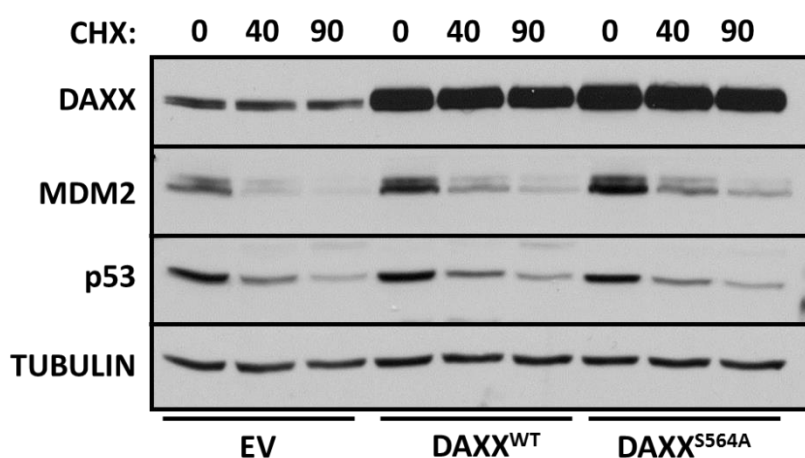
Obrázek 32: Fosforylace S564 nemá vliv na expresi genů transaktivovaných proteinem p53. Linie U2OS stabilně exprimující DAXX^{WT} (WT) nebo DAXX^{S564A} (S564A) byla inkubována s VP16 (40 uM) po dobu 2, 4 a 6 hodin. Expze genů byla změněna a porovnána pomocí qPCR. Hodnoty byly normalizovány na průměr referenčních genů (*ALAS*, *GAPDH* a *ACTB*). Vyneseny jsou změny expze jednotlivých genů v násobcích referenční hladiny (tj. buňek s nadprodukovaným DAXX^{WT} bez poškozené DNA).



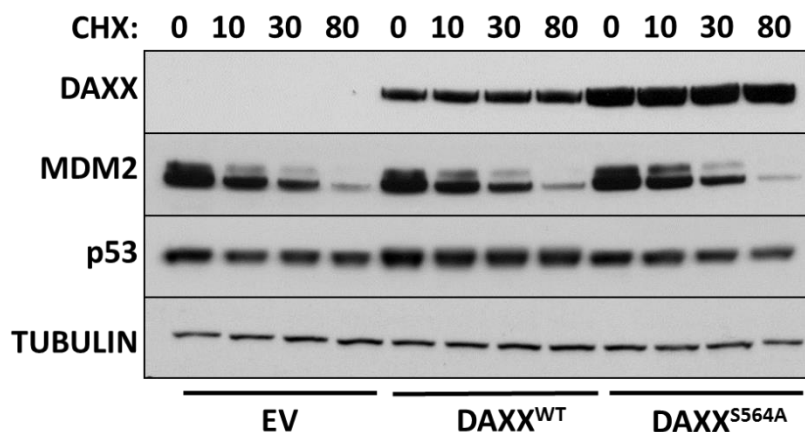
Obrázek 33: Nadprodukovaný DAXX nemá vliv na zvýšení proteinové expze p21 nebo PUMA a nemá vliv na stabilizaci p53 po genotoxickém stresu. Linie U2OS stabilně exprimující DAXX^{WT} (WT) nebo DAXX^{S564A} (S564A) byla inkubována s VP16 (40 uM) po dobu 4 a 8 hodin. Proteiny byly analyzovány pomocí WB uvedenými protilátkami.

Dle navrženého modelu Tang et al. [86] vede nadprodukce DAXX ke zvýšené tvorbě komplexu MDM2-HAUSP-DAXX. Po inhibici translace je v těchto buňkách MDM2 více zadržován v komplexu, kde jeho stabilizace deubikvitinylací enzymem HAUSP vede k rychlejší degradaci p53. Naopak v buňkách se sníženou expresí proteinu DAXX [160] je MDM2 degradován rychleji, což by mělo vést k vyšší stabilitě p53.

Vzhledem k tomu, že je tento princip klíčový pro fungování navrženého modelu, rozhodli jsme se jej ověřit i v našich experimentálních podmínkách. V buněčné linii U2OS jsme nadprodukovali DAXX pomocí transienční transfekce. Na rozdíl od Tang et. al jsme nepozorovali žádný rozdíl v rychlosti degradace MDM2 (popř. stabilizaci p53), a to jak za nestresových podmínek, tak i po genotoxickém stresu (kdy by měla být degradace MDM2 rychlejší) (Obrázek 34, Obrázek 35).

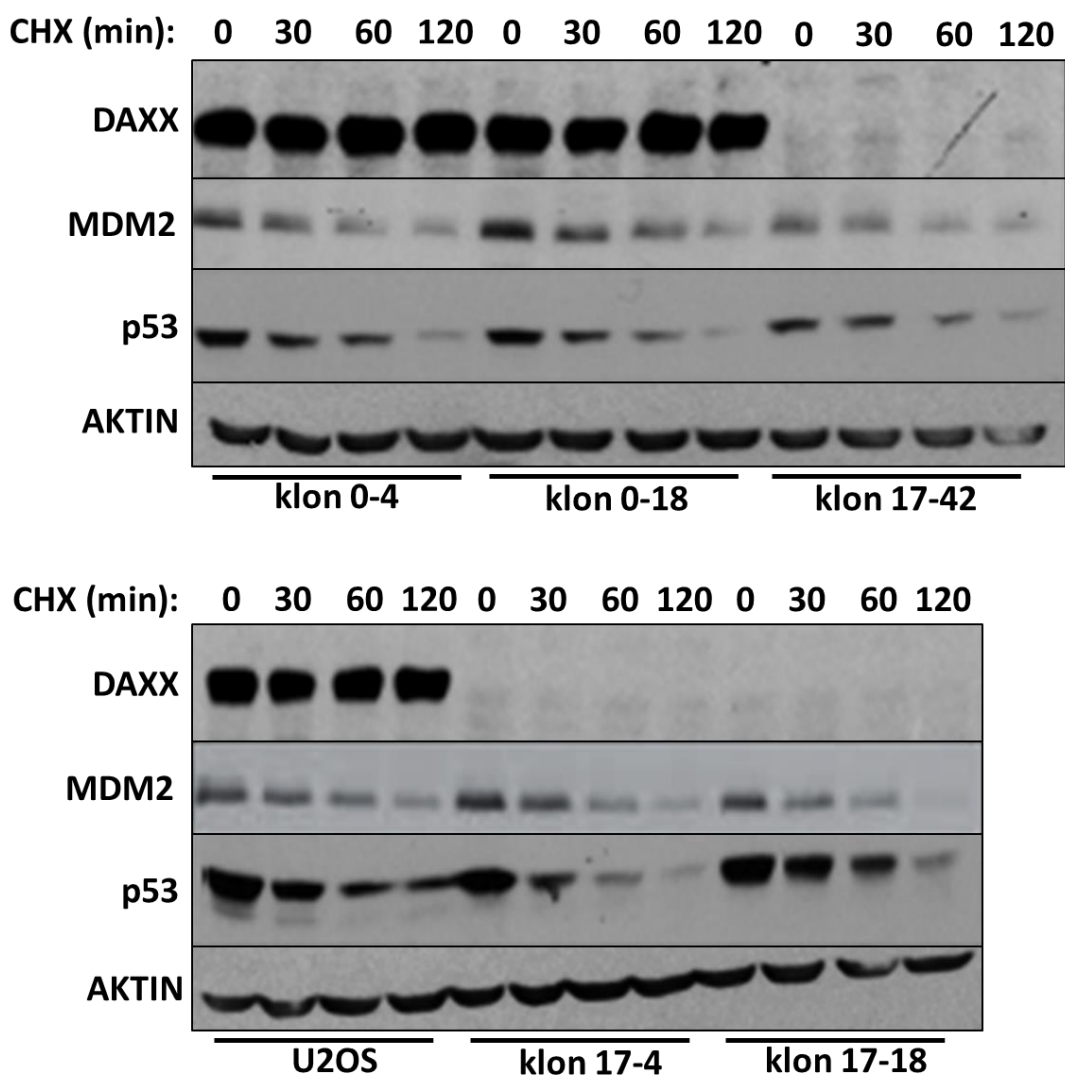


Obrázek 34: Nadprodukce DAXX nemá vliv na rychlost degradace MDM2. Linie U2OS byla transfekována plasmidem pXJ41-HDM2 (lidský MDM2) spolu s FLAG-CMV (EV; prázdný vektor) nebo FLAG-DAXX^{WT} (WT) nebo FLAG-DAXX^{S564A} (S564A). Do media byl přidán CHX (40 µl/ml). Vzorky pro WB analýzu byly odebírány ve vyznačených časech. Proteiny byly detekovány na WB pomocí uvedených protilátek.



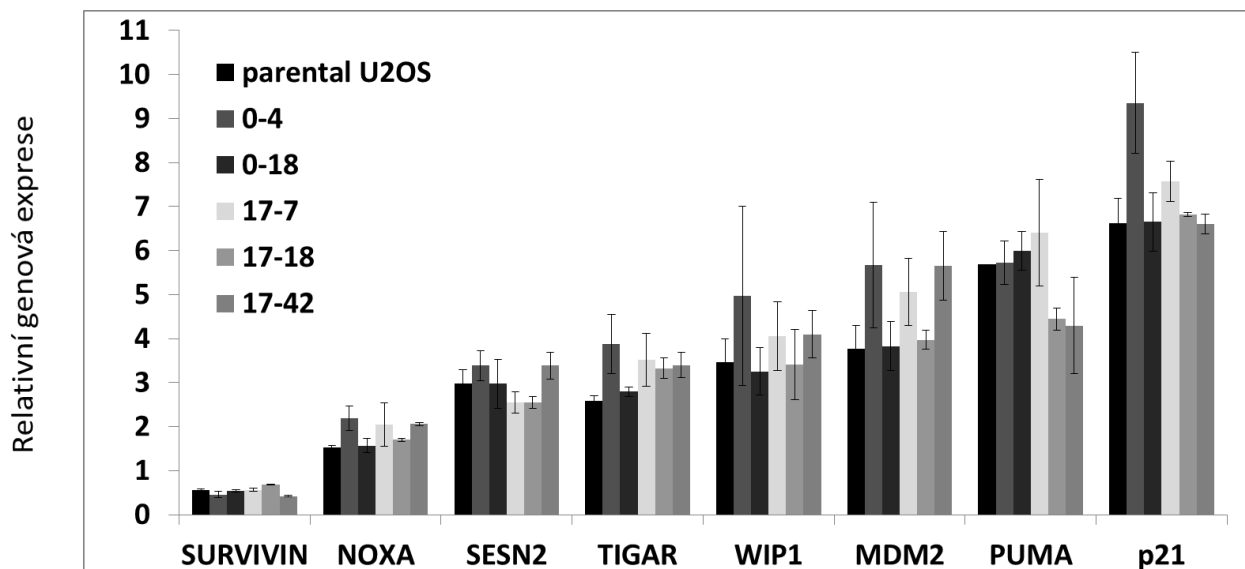
Obrázek 35: Nadprodukce DAXX nemá vliv na rychlost degradace MDM2 v přítomnosti genotoxického stresu. Linie U2OS byla transfekována plasmidy FLAG-CMV (EV) nebo FLAG-DAXX^{WT} (WT), nebo FLAG-DAXX^{S564A} (S564A). Po inkubaci s 8nM NCS (8 hodin) byl do média přidán CHX (40 µl/ml). Vzorky pro analýzu byly odebírány ve vyznačených časech. Proteiny byly detekovány na WB pomocí uvedených protilátek.

Vedle ujasnění vlivu nadprodukovaného proteinu DAXX na stabilitu MDM2 a p53 jsme analyzovali i efekt jeho snížené hladiny. Vzhledem k tomu, že RNA interference pouze snižuje genovou expresi (a zároveň může mít i nespecifické efekty), zvolili jsme jiný metodický přístup - genetickou delecí *DAXX* pomocí technologie TALEN v buněčné linii U2OS. Buňky s odstraněnou expresí DAXX (*DAXX*^{-/-}) a kontrolní buňky (*DAXX*^{+/+}) byly spolu s parentální linií U2OS inkubovány s cykloheximidem. Rychlost degradace MDM2 byla analyzována pomocí WB (Obrázek 36). Kinetika degradace MDM2 a stabilizace p53 však zůstaly stejné bez ohledu na přítomnost či absenci proteinu DAXX.

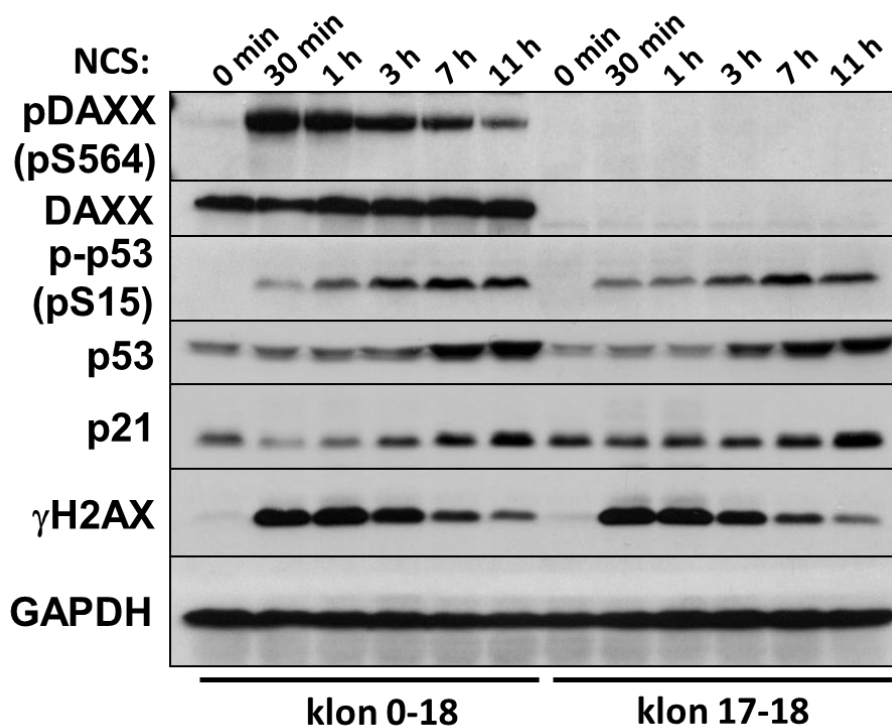


Obrázek 36: Absence DAXX nemá vliv na rychlost degradace MDM2. V linii U2OS byl DAXX geneticky deletován. Do média byl k buňkám přidán CHX (40 µl/ml). Vzorky pro analýzu byly odebírány ve vyznačených časech. Proteiny byly detekovány pomocí WB uvedenými protilátkami. U2OS (parentální linie); klony 0-18 a 0-4 (negativní kontrola: *DAXX*^{+/+}); 17-7, 17-18 a 17-42 (klony *DAXX*^{-/-}).

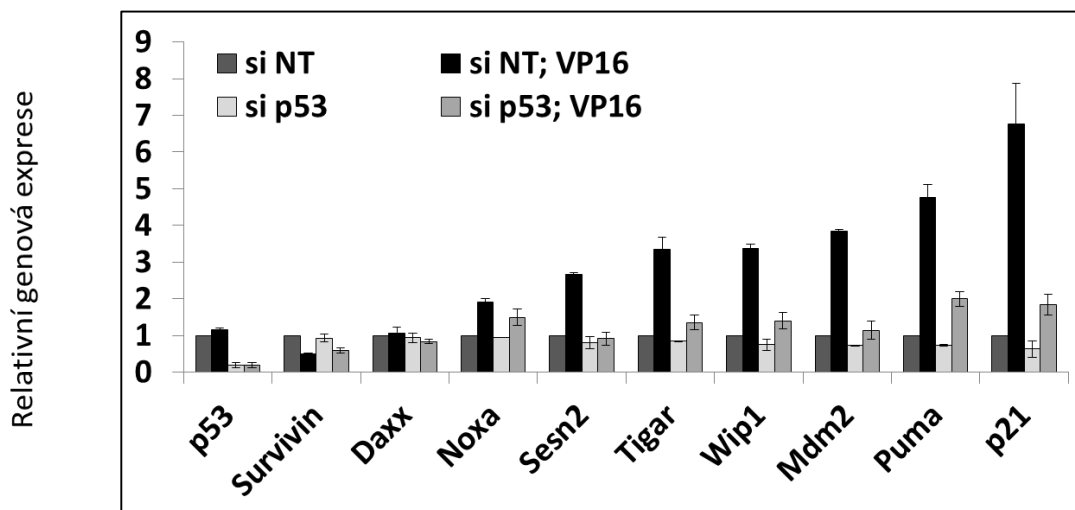
V těchto *DAXX*^{-/-} buňkách jsme také pomocí qPCR kvantifikovali změnu transkripce devíti vybraných genů regulovaných během odpovědi na genotoxický stres transkripčním faktorem p53 (Obrázek 37). Po inkubaci s VP16 byla hladina mRNA těchto genů zvýšena ve stejné míře nezávisle na přítomnosti *DAXX*. Změnu exprese p21 jsme také analyzovali pomocí WB (Obrázek 38). Také na proteinové úrovni byl p21 zvýšen ve stejné míře v buňkách s/bez *DAXX*, což bylo v souladu s naším předchozím pozorováním ale v rozporu s publikovanými daty [160]. Vzhledem k faktu, že U2OS je nádorovou linií s nestabilním karyotypem [161], mohla být jednou z příčin diskrepance mezi našimi a publikovanými výsledky mutace v *TP53* vedoucí ke ztátě funkce p53. Ověřili jsme tedy funkčnost transkripčního faktoru p53. Pomocí RNA interference jsme v buňkách U2OS snížili množství p53 a vystavili tyto buňky genotoxickému stresu (Obrázek 39). Snížení hladiny p53 vedlo k výraznému utlumení exprese genů závislých na p53, což dokazovalo, že je v této linii transkripční funkce p53 zachována.



Obrázek 37: Genetická delece *DAXX* nemá vliv na změnu exprese genů regulovaných p53. Buňky U2OS byly inkubovány s VP16 (10uM) po dobu 8 hodin. mRNA příslušných genů byla analyzována pomocí qPCR. Hodnoty byly normalizovány na průměr referenčních genů (*ACTB*, *ALAS* a *SDH*). U2OS (parentální linie); klon 0-18 a 0-4 (negativní kontrola: *DAXX*^{+/+}); 17-7, 17-18 a 17-42 (klony *DAXX*^{-/-}). Vyneseny jsou relativní změny exprese jednotlivých genů v násobcích referenční hladiny (tj. parentální linie U2OS).

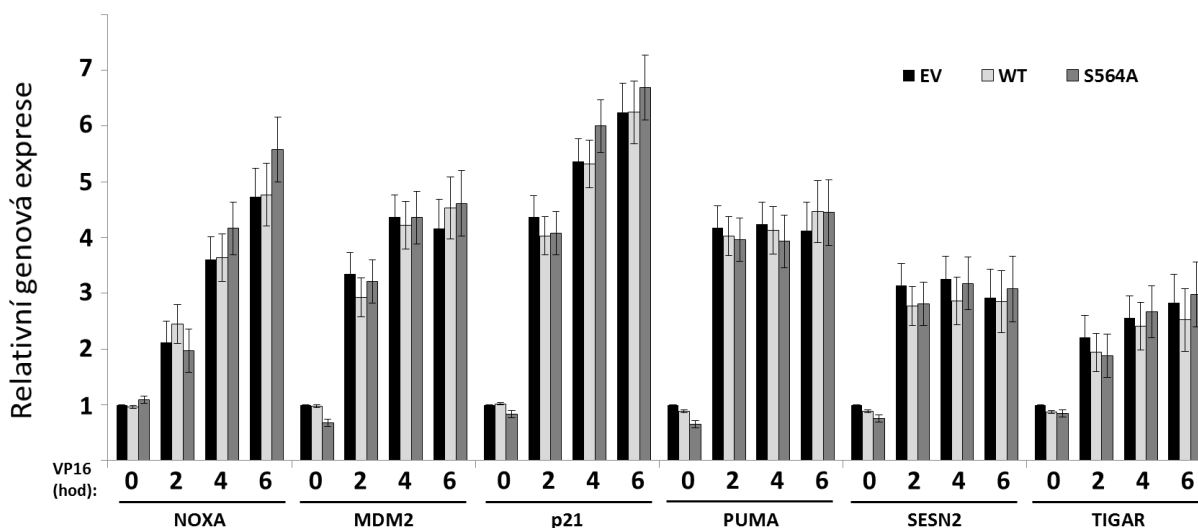


Obrázek 38: Hladina proteinů p21 a p53 se po genotoxickém stresu zvyšuje nezávisle na přítomnosti/absenci DAXX. Buněčné klony 0-18 (*DAXX*^{+/+}) a 17-18 (*DAXX*^{-/-}) byly inkubovány s NCS (4 nM), vzorky pro WB analýzu byly odebírány ve vyznačených časech.



Obrázek 39: Buňky U2OS obsahují transkripčně aktivní p53. Buňky byly transfekována kontrolní siRNA (si NT) nebo siRNA proti p53 (si p53). Třetí den po transfekci byly buňky inkubovány 8 hodin s VP16 (10uM). RNA byla po izolaci analyzována pomocí qPCR. Hodnoty cp byly normalizovány na průměrný referenční gen (*ALAS*, *RPL37a* a *SDH*). Vyneseny jsou relativní změny exprese jednotlivých genů v násobcích referenční hladiny (tj. buňek s transfekovanou siNT a bez VP16).

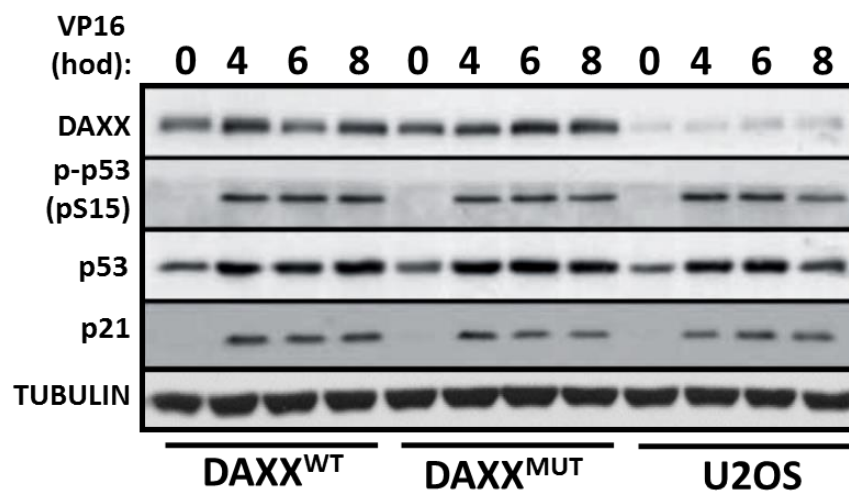
Jak již bylo uvedeno výše, karyotyp buněčné linie U2OS je nestabilní a s postupem času mohou linie pasážované v jednotlivých laboratořích akumulovat tak velký počet mutací, že je možné mluvit už o „kmenech“ těchto linií - podobně například u linie HeLa již bylo identifikováno několik kmenů [162]. Abychom se přesvědčili, že případný nesoulad mezi našimi výsledky a publikovaným modelem není důsledkem těchto genetických změn, zopakovali jsme klíčové experimenty na primární linii BJ⁴⁵. Ani v této linii nevedla stabilní nadprodukce DAXX (DAXX^{WT} nebo DAXX^{S564A}) k rozdílu v expresi genů závislých na p53 (Obrázek 40). Stejně tak jsme nepozorovali žádné změny ve stabilitě p53 či zvýšení proteinové hladiny p21 (Obrázek 41). Protože u této linie nebylo možné použít genetickou delecí⁴⁶, snížili jsme zde DAXX pomocí směsi několika siRNA DAXX (Obrázek 42). I v tomto případě byla hladina p21 zvýšené nezávisle na množství DAXX. V souhrnu naše výsledky poukazují na to, že protein DAXX, alespoň v námi použitých modelových systémech, neovlivňuje ani stabilitu proteinů MDM2 a p53 a ani transaktivaci genů indukovanou p53 po genotoxickém stresu.



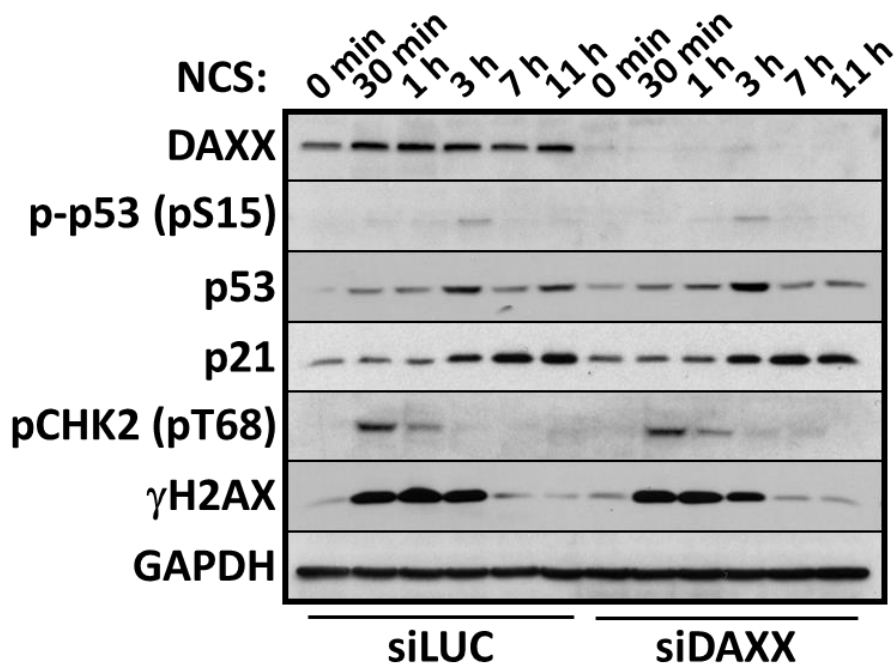
Obrázek 40: Fosforylace DAXX na S564 nemá vliv na expresi genů regulovaných p53. Fibroblasty BJ stabilně exprimující DAXX^{WT} nebo DAXX^{S564A} byly inkubovány s VP16 (40 uM) po dobu 2, 4 a 6 hodin. Expresie genů byla kvantifikována pomocí qPCR. Hodnoty byly normalizovány na průměrný referenční gen složený z genů *ALAS*, *SDH* a *ACTB*. Vyneseny jsou relativní změny exprese jednotlivých genů v násobcích referenční hladiny, tj. kontrolních buněk (transdukovaných prázdným vektorem; EV) bez inkubace s VP16.

⁴⁵ neměli jsme k dispozici původní linii U2OS, se kterou bychom mohli porovnat naši linii U2OS.

⁴⁶ buňky BJ (primární linie) mají omezený počet dělení a nebylo by možné získat po klonální selekci dostatek buněk (resp. buněčných dělení) pro další pokusy.



Obrázek 41: Nadprodukce DAXX^{WT} nebo DAXX^{S564A} nemá vliv na zvýšení hladiny p21 na stabilitu p53 po poškození DNA. Fibroblasty BJ stabilně exprimující DAXX^{WT} nebo DAXX^{S564A} byly inkubovány s VP16 po dobu 4, 6 nebo 8 hodin. Proteiny byly detekovány pomocí WB a uvedených protilátek.

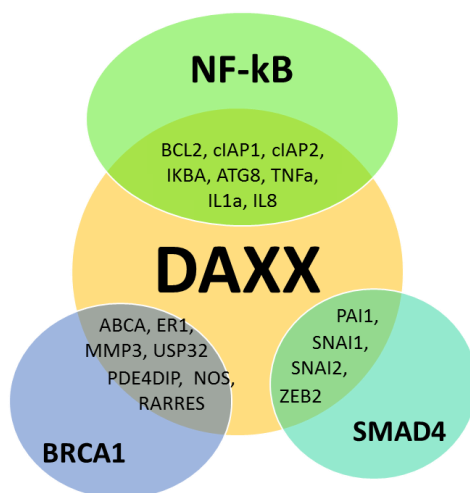


Obrázek 42: Snížení hladiny DAXX ve fibroblastech nemá vliv zvýšení hladiny p21. Buňky BJ byly transfekovány směsí siRNA proti DAXX (siDAXX nebo kontrolní siRNA (siLUC)). Po třech dnech byly buňky inkubovány s NCS a v uvedených časových bodech odebrány vzorky pro WB analýzu.

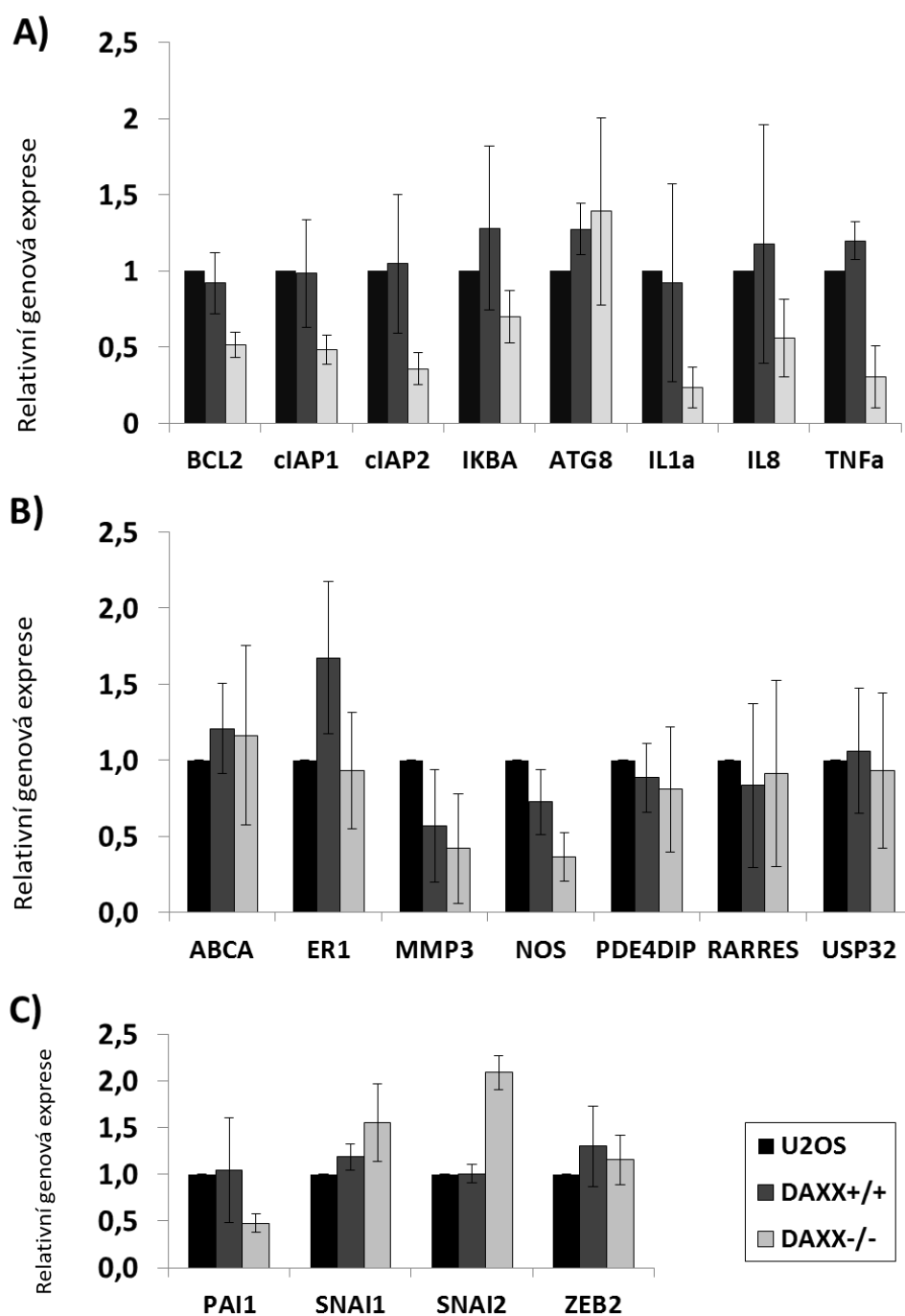
5.2.3 Vliv proteinu DAXX na aktivitu NF- κ B, SMAD4 a BRCA1

Vedle aktivace p53 je s poškozením DNA spjatá i genová exprese aktivovaná dalšími transkripčními faktory spojenými s DAXX. Využitím námi připravených buněk s geneticky eliminovanou expresí DAXX jsme se dále zaměřili na analýzu těch genů, jejichž exprese je kontrolována některým z těchto transkripčních faktorů: NF- κ B, SMAD4 a BRCA1 (Obrázek 43).

Významnou signalizační kaskádou, která je aktivována v rámci DDR, je NF- κ B [163], [164]. Rodina transkripčních faktorů NF- κ B má pět členů: NF- κ B1, NF- κ B2, RelA, RelB a c-Rel. DAXX byl popsán jako negativní regulátor RelB [124] a RelA [165]. Hlavní funkcí těchto faktorů je transkripce proti-apoptotických ale i pro-autofagických genů a také některých cytokinů a proto jsme vybrali celkem 8 genů zastupujících jednotlivé skupiny cílových genů. Dalším transkripčním faktorem, na jehož aktivitě se DAXX podílí, je SMAD4 [79]. Pro studium jsme vybrali celkem pět genů regulovaných SMAD4 [166], [167]. Poslední skupinou genů, kterou jsme se rozhodli analyzovat, byly geny transkripčně závislé na proteinu BRCA1. Přímý vliv proteinu DAXX na transkripční aktivitu BRCA1 (zatím) nebyl prokázán, avšak naše laboratoř ukázala, že adaptor DAXX je součástí komplexu SWI/SNF – komplexu remodelujícího chromatin [168]. Zároveň Bochar et al. [169] prokázali, že se stejným komplexem může být asociován i BRCA1. Harte et al. [170] později ukázali, že transkripční aktivita BRCA1 je pozitivně regulována proteinem BRD7 – další komponentou komplexu SWI/SNF. Vzhledem k možnému funkčnímu propojení DAXX-SWI/SNF-BRCA1 jsme se rozhodli analyzovat i několik genů regulovaných BRCA1. Z rozsáhlé studie mapující transkripční cíle BRCA1 jsme vybrali několik genů, jejichž exprese závisela na BRCA1 a zároveň se měnila po genotoxickém stresu (Obrázek 43).

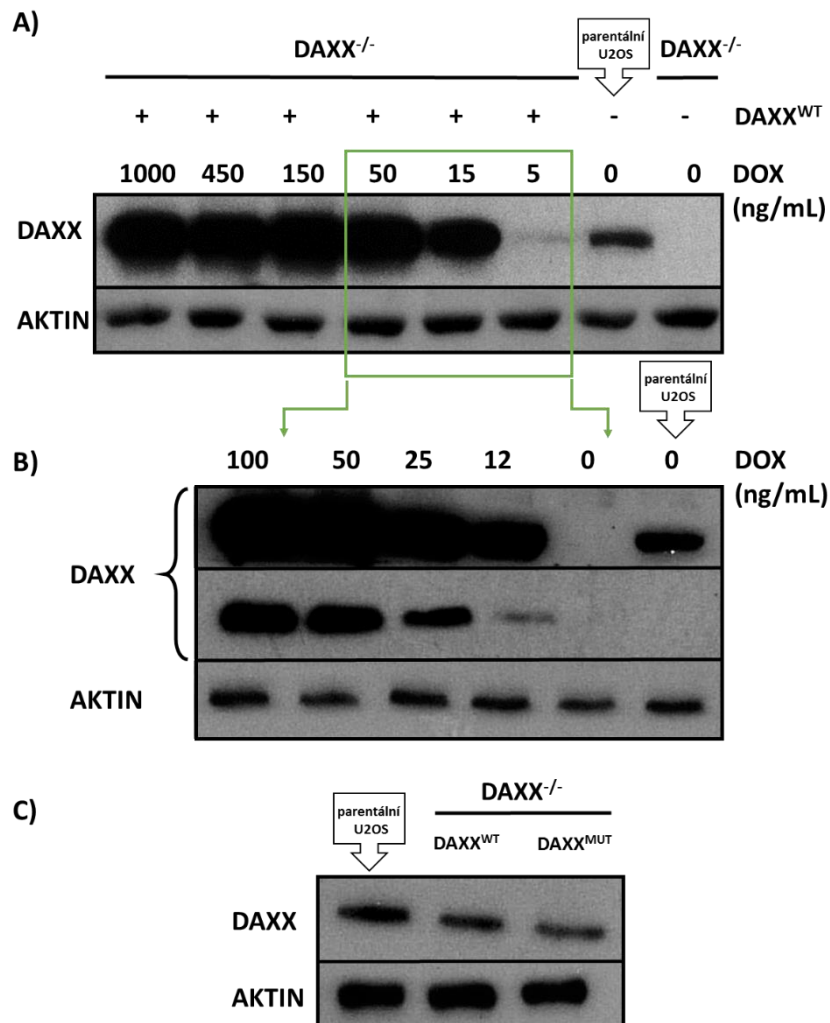


Obrázek 43: DAXX se podílí na regulaci aktivity transkripčního faktoru RelB (z rodiny NF- κ B) a SMAD4. Regulace BRCA1 proteinem DAXX zatím potvrzena nebyla (vysvětlení v textu). V průniku jednotlivých množin jsou uvedeny vybrané geny regulované daným transkripčním faktorem.



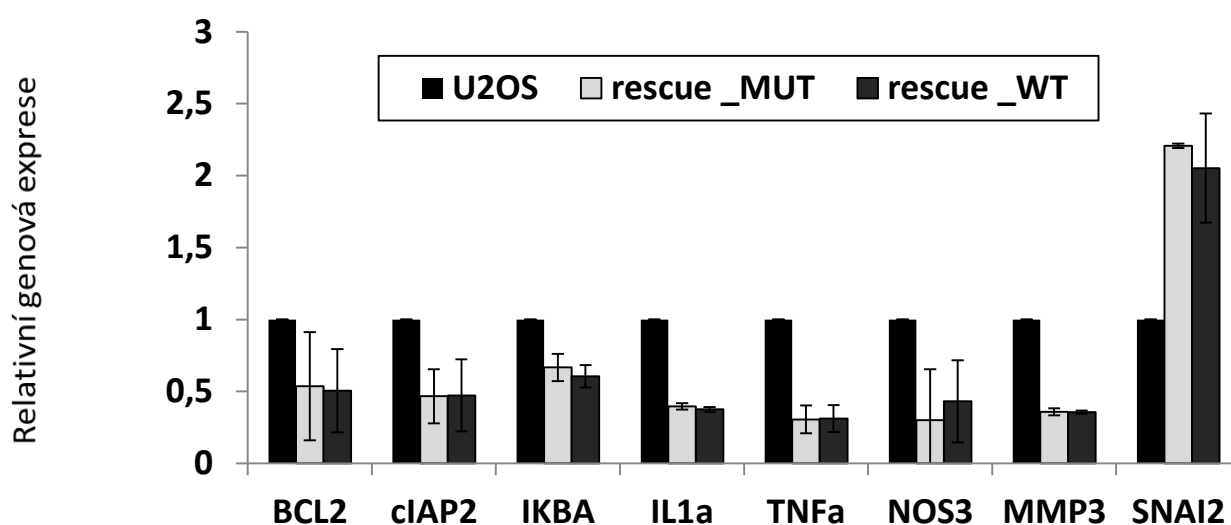
Obrázek 44: Expresse genů aktivovaných analyzovanými transkripčními faktory v buňkách U2OS DAXX^{+/+} a DAXX^{-/-}. Geny byly rozděleny do tří skupin: geny regulované NF- κ B (A); BRCA1 (B) a SMAD4 (C). Buněčné klony 0-7 a 0-18 (DAXX^{-/-}) byly při pasáži smíchány s klony 17-7, 17-18 a 17-42 (DAXX^{+/+}) ve stejném poměru. Následující den byla izolovaná RNA jednak z těchto směsných kultur a jednak z parentální linie U2OS (U2OS). Expresse genů byla z izolované RNA kvantifikována pomocí qPCR. Hodnoty byly normalizovány na průměrný referenční gen složený z genů *ALAS*, *HMBS* a *RPL37a*. Vyneseny jsou relativní změny exprese jednotlivých genů v násobcích referenční hladiny (tj. parentální linie U2OS).

U vybraných genů ze všech tří skupin jsme nejdříve analyzovali změnu jejich exprese v závislosti na přítomnosti/absenci adaptoru DAXX (Obrázek 44 A-C). U vhodných kandidátů, tedy genů se změněnou hladinou exprese v buňkách U2OS *DAXX*^{-/-}, jsme pak otestovali specifitu této závislosti zpětnou introdukcí proteinu DAXX do buněk U2OS *DAXX*^{-/-}. Vhodnými kandidáty byly *BCL2*, *cIAP1*, *cIAP2*, *IKBA*, *IL1a*, *TNFa* ze skupiny genů kontrolovaných NF-κB; *NOS* transkripčně regulovaný BRCA1 a dále pak *SNAI2* regulovaný transkripčním faktorem SMAD4.



Obrázek 45: Stanovení optimální koncentrace doxycyklinu pro rekonstituci fyziologické exprese DAXX. A) tři klony U2OS *DAXX*^{-/-} (17-7, 17-18 a 17-42) byly smíchané ve stejném poměru a transdukovány plasmidem pLVX-TetONE-DAXX^{WT} (DAXX^{WT}) nebo pLVX-TetONE-DAXX^{S564A} (DAXX^{MUT}). Po selekci puromycinem byl k buňkám přidán na dva dny doxycyklin nejdříve ve velkém koncentračním rozpětí 1000-5 ng/ml. B) menší koncentrační rozpětí doxycyklinu. C) optimální koncentrace doxycyklinu se pohybovala mezi 8-10 ng/ml (pozn. doxycyklin se při teplotách 37C rozkládá a při dlouhodobých inkubacích jeho koncentrace kolísá).

Při reintrodukcii proteinu DAXX jsme se rozhodli pro inducibilní systém, kde je možné kontrolovat expresi doxycyklinem a vyhnout se tak situaci, kdy je ektopicky exprimovaný protein nefyziologicky nadprodukován. První titrace doxycyklinem v širokém koncentračním rozpětí 4-1000 ng/ml ukázala, že systém je doxycyklinem nasycen již při koncentraci 50 ng/ml (Obrázek 45A). Použití menšího koncentračního rozpětí ukázalo, že optimální koncentrace doxycyklinu, při které je proteinová hladina DAXX srovnatelná s endogenní hladinou, je mezi 8-10 ng/ml (Obrázek 45B,C). Z buňkách U2OS *DAXX*^{-/-} s reintrodukovaným proteinem DAXX jsme izolovali RNA a porovnali expresi genů s parentální linií. Překvapivě, ani v jednom případě se hladina genů nevrátila na svou původní úroveň (Obrázek 46).



Obrázek 46: Rekonstituce fyziologické exprese proteinu DAXX v linii U2OS *DAXX*^{-/-} nevrátí expresi genů na původní hladinu. Směs klonů U2OS *DAXX*^{-/-} byla transdukována plasmidem pLVX-TetONE-DAXX^{WT} (rescue_WT) nebo pLVX-TetONE-DAXX^{S564A} (rescue_MUT). Po příslušné selekci byly buňky inkubovány 48 hodin s doxycyklinem (10 ng/ml). Expres genů byla z izolované RNA kvantifikovaná spolu s parentální linií U2OS pomocí qPCR. Hodnoty byly normalizovány na průměrný referenční gen složený z genů *ALAS*, *HMBS* a *RPL37a*. Vyneseny jsou relativní změny exprese jednotlivých genů v násobcích referenční hladiny (tj. parentální linie U2OS).

6 Diskuze

Od svého objevu v roce 1997 byl DAXX implikován v řadě esenciálních buněčných procesů jako je apoptóza, regulace transkripce nebo sbalování histonů. Vzhledem k absenci enzymové aktivity jsou tyto funkce proteinu DAXX regulovány pouze proteinovými interakcemi a PTM, z nichž nejvýznamnější jsou fosforylace. Vedle konstitutivních fosforylací byly identifikovány i indukovatelné fosforylace adaptoru DAXX, kdy např. kináza HIPK1 fosforyluje S669. Tato fosforylace reguluje afinitu DAXX k histonu H3.3 a jeho ukládání do promotorových oblastí, čímž dochází ke změně transkripce některých neuronově specifických genů [83], [84].

V naší práci jsme ukázali, že DAXX je po poškození DNA fosforylován na aminokyselině serin 564 (S564), což je v souladu s paralelně publikovanou studií Tang et al. [160]. K této fosforylaci dochází v rámci buněčné odpovědi na dvojřetězcové zlomy DNA - a to jak u neblokovaných zlomů (způsobené např. NCS nebo IR), tak i u zlomů s blokovanými konci (produkt působení VP16). Tato fosforylace S564 má rychlý nástup srovnatelný s fosforylací ostatních proteinů tzv. časné odpovědi na DDR (jako např. p53 nebo kinázy CHK1 a CHK2). Ve srovnání s transientními fosforylacemi těchto proteinů ale fosforylace proteinu DAXX přetrvává až 24 hodin od indukce poškození.

Překvapivě jsme však při mapování fosforylovaného místa, na rozdíl od Matsuoka et al. [1], nepotvrdili fosforylovaný T712, a to ani při aplikaci stejného typu poškození DNA na stejnou buněčnou linii. Možným vysvětlením je použití odlišných metodických přístupů a modelových buněk. V původní práci autoři použili k detekci fosforylovaných míst SILAC a sérii paralelních imunoprecipitací panelem cca šedesáti protilátek křížově reagujících se známými substráty ATM, po nichž následovala identifikace peptidových fragmentů pomocí LC-MS/MS. Tento přístup však má omezení ovlivněné dvěma hlavními faktory: afinitou použitých protilátek a poměrem precipitovaných fragmentů daným množstvím/fosforylací precipitovaných proteinů. Třebaže se k precipitaci využily protilátky křížově reagující proti několika desítkám proteinů, mapování sítě substrátů kináz ATM/ATR/DNA-PK nebylo úplné. Například kináza ATM fosforyluje protein BRCA1 na S1524 a ačkoliv je tento typický substrát kinázy ATM rozpoznávaný protilátkou proti motivu pSQ/pTQ (viz informace výrobce protilátky), nebyl ve studii Matsuoka et al. [1] detekován fragment proteinu BRCA1 s fosfoserinem pS1524 v imunoprecipitátech s touto protilátkou pSQ/pTQ, ale jen po precipitaci protilátkami BRCA1 (pS1524) a RPA32 (pS33). Podobně ani DAXX pT712 nebyl ve stejné studii identifikován v imunoprecipitacích s protilátkou pSQ/pTQ. Fragment obsahující pT712 byl identifikován ve dvou nezávislých experimentech za použití protilátek rozpoznávajících fosforylované proteiny MCM2 a RAD17 (pS108 resp. pS645). Stejně tak ani my jsme nepotvrdili fosforylaci DAXX pT712 s použitím protilátky proti pSQ/pTQ motivu, což však nedokazuje neexistenci této fosforylace. Epitop obsahující pT712 prostě nemusí být rozpoznávaný

univerzální protilátkou proti pSQ/pTQ. Vhodnějším způsobem pro ověření T712 by pravděpodobně byla metodicky náročnější analýza fosforylací proteinu DAXX pomocí hmotnostní spektrometrie. Naopak epitop obsahující pS564 sice je rozpoznávaný protilátkou proti pSQ/pTQ, ale při imunoprecipitaci v diskutované studii mohla být většina kapacity obsazena více se vyskytujícími nebo více fosforylovanými proteiny, a množství precipitovaného DAXX pS564 tak nedosáhlo detekčního prahu pro analýzu následné LC-MS/MS.

Některé proteiny účastnící se DDR jsou fosforylovány jakoukoliv z apikálních kináz (ATM, ATR, DNA PK), jiné jsou výhradním substrátem pouze jedné z nich. Naše experimenty použitím shRNA a zejména pak specifických inhibitorů proti jednotlivým apikálním kinázám ukázaly, že fosforylace serinu 564 je závislá výhradně na kináze ATM. Inhibice dalších členů kináz z této skupiny (kinázy ATR nebo DNA-PK) fosforylací DAXX na S564 po poškození DNA nesnížila. Překvapivě, inhibice DNA-PK dokonce v některých případech zvýšila nejen fosforylací DAXX na S564, ale i dalších substrátů ATM (např. KAP1). Vysvětlením tohoto nečekaného zjištění by mohla být změna buněčné odpovědi na DSB. Za normálních okolností je cca 80% DSB opraveno NHEJ, tedy mechanismem spouštěným DNA-PK. Při inhibici této kinázy a tedy celého mechanismu NHEJ může tedy dojít ke kompenzaci, kdy všechny dvojřetězcové zlomy aktivovaly kinázu ATM.

Fosforylace indukované v buňce během reakcí na určité podněty jsou odstraňovány fosfatázami. Na defosforylací proteinů účastnících se DDR se významně podílí fosfatáza WIP1, mezi jejíž substráty patří např. p53, ATM, MDM2, CHK1 nebo CHK2. Naše experimenty ukázaly, že tato fosfatáza také hraje významnou úlohu v defosforylací proteinu DAXX. V normálně proliferujících buňkách je udržována nízká exprese WIP1 [62] a zvyšuje se během odpovědi na poškození DNA. V naší studii jsme u primárních lidských fibroblastů BJ zjistili časovou korelaci mezi zvýšením hladiny WIP1 a snížením fosforylace DAXX na S564. Naopak snížení hladiny WIP1 vedlo jednak k zvýšení pS564 a jednak k pomalejší defosforylací. Tento jev byl výraznější u buněk nádorových linií, kde je bazální hladina WIP1 několikanásobně vyšší než u linie BJ. Ačkoliv nemáme přímý důkaz, že DAXX je defosforylován touto fosfatázou in vivo, prokázali jsme, že rekombinantní WIP1 velmi účinně defosforyluje S564 in vitro. Ani tak nemůžeme na základě našich výsledků vyloučit, že je pS564 substrátem dalších fosfatáz. Bližší charakterizace mechanismu defosforylace in vivo vyžaduje podrobnější studium.

Fosforylace proteinů mohou během DDR regulovat proteinové interakce - např. fosforylace histonu H2AX vede k vazbě proteinu MDC1 do místa zlomu a vzniku následného opravného komplexu [62]; změnu jejich aktivity (např. fosforylace N-koncových serinů transkripčního faktoru p53 výrazně zvyšuje jeho transaktivační potenciál – [171] nebo mohou vést k následným postranlačním modifikacím. Naproti tomu I κ B, klíčový regulátor signální dráhy NF- κ B, je po fosforylací kinázou IKK ubikvitinylován a následně degradován [172]. Stejná kináza fosforyluje i

p53, což opět vede k ubikvitinylaci a degradaci p53, a to nezávisle na MDM2 [173]. V naší snaze odhalit vliv fosforylace S564 na molekulární či funkční vlastnosti proteinu DAXX jsme na několika buněčných liniích sledovali možný vliv této fosforylace na stabilitu DAXX a případně na kinetiku jeho degradace. Za fyziologických (nestresových) podmínek je DAXX velmi stabilním proteinem [158], což jsme si potvrdili i v našich experimentech. Publikovaná data ale naznačují, že za určitých stresových podmínek (např. po UV ozáření buněk [159]) může být DAXX degradován. Na rozdíl od publikovaných výsledků jsme ale u námi použitých buněčných linií, včetně ve výše zmíněné publikaci použitých HeLa buněk, nepozorovali žádný vliv UV záření na kinetiku degradace proteinu DAXX. Oproti očekávání jsme však zjistili, že vysoké dávky UV záření vedly k mírné fosforylaci DAXX S564, ale pouze v nádorové linii U2OS. Kontrolní experiment s použitím mutované formy DAXX^{S564A} však ani v tomto případě nepotvrdil jakoukoliv změnu v rychlosti degradace. Také indukce dvojřetězcových zlomů ionizačním zářením, které výrazně zvyšovalo fosforylaci S564, neměla vliv na stabilitu DAXX. Naše metodické a experimentální přístupy byly relevantní a reprodučibilní, a tak nemáme uspokojivé vysvětlení pro rozpor mezi naším pozorováním a publikovaným poznatkem, že DAXX je rapidně degradován po UV záření. Jedním z důvodů by však mohl být fundamentální problém použitého modelového systému, a to genomová/karyotypová nestabilita nádorových linií. Např. u diskutovaných nádorových buněk HeLa bylo již popsáno několik tzv. odvozených linií a zároveň byly prokázány její kontaminace buňkami jiného živočišného původu [174], [175]. Dnes, 65 let po izolaci, se tak mohou kultury HeLa buněk v různých laboratořích lišit v mnoha ohledech, což může vést k nereprodukovatelnosti výsledků.

Jak již bylo zmíněno výše, fosforylace mohou vedle degradace a stability regulovat i interakci mezi proteiny. U adaptoru DAXX bylo popsáno několik proteinových interakcí regulovaných fosforylací serinu nebo threoninu. Např. fosforylace S667⁴⁷ [176] vede k vazbě DAXX na jaderný exportní protein CRM1 následovaný exportem komplexu DAXX-CRM1 z jádra. Kináza ASK1 fosforyluje DAXX na aminokyselinách S176 a S184, což je nezbytné pro udržení aktivity kinázy JNK během odpovědi spuštěné ligandem TNFα [177]. Více prostudovaná je fosforylace mžšího Daxx na S669, která ovlivňuje vazbu H3.3 do promotorových oblastí a následnou transkripci genů. Tato modifikace je regulována vzájemnou součinností kinázy HIPK1 a fosfatázy kalcineurin [84]. Vzhledem k tomu, že nejvíce prostudovanou funkcí DAXX je právě regulace transkripce, zaměřili jsme se proto v dalších experimentech na možnou roli fosforylace S564 v transkripční odpovědi na poškození DNA.

Nejdříve jsme analyzovali vliv adaptoru DAXX na stabilitu a aktivitu jednoho z klíčových transkripčních faktorů účastnících se DDR – proteinu p53. Dle Tang et al. [86] je stabilita p53

⁴⁷ Tato aminokyselina S667 odpovídá dle Genebank S668 (NP_001135441).

přínejmenším zčásti regulována pomocí komplexu obsahujícího adaptor DAXX, E3 ligázu MDM2, ubikvitinhydrolázu HAUSP a transkripční faktor p53. Poškození DNA vede zprostředkovaně k destabilizaci tohoto komplexu a k následné aktivaci transkripce genů závislých na p53 (např. *p21*, *MDM2*, *PIG3* nebo *PUMA*). Podobně nadprodukce proteinu DAXX v buňkách vede k snížení exprese těchto genů v důsledku rychlejší degradace p53. Na rozdíl od Tang et al. [86] tvrdí Gostissa et al. [178], že DAXX proteinovou hladinu p53 vůbec neovlivňuje, nýbrž reguluje jeho transkripční aktivitu jiným (autory blíže neurčeným) mechanismem. Také výsledný efekt je dle autorů odlišný: nadprodukce DAXX neočekávaně zvyšuje hladinu mRNA proteinu *PUMA*, zatímco hladina genů *BAX* nebo *PIG3* se nemění a transkripce genů *p21* a *MDM2* se snižuje. Z těchto publikovaných poznatků je patrné, že vliv DAXX na transkripční aktivitu p53 nebyl doposud uspokojivě vysvětlen. Důvodů pro tuto vzájemně si odporující tvrzení může být několik. Některé studie používaly k měření aktivity pouze p53 luciferázové reportery spolu s nefyziologickou nadprodukcí studovaných proteinů (popř. jejich delečních mutant), v některých pracech byla k snížení hladiny DAXX použita pouze jedna siRNA (a nevyloučila se tak možná nespecifita použité siRNA). Pro získání dat byly rovněž použity různé buněčné systémy: nádorové i primární linie myšičího i lidského původu. Naše snaha objasnit úlohu adaptoru DAXX a význam jeho fosforylace v komplexu DAXX/MDM2/HAUSP/p53 nebyla ojedinělá. Jiná vědecká skupina se rovněž zabývala možnou regulační rolí proteinu DAXX v rámci tohoto komplexu [160]. Avšak v rozporu s jejich výsledky naše data nejen, že neprokázala vliv fosforylace S564 na rozpad výše zmíněného komplexu, ale dokonce nepotvrdila vliv samotného adaptoru DAXX na stabilitu MDM2 nebo p53 během odpovědi na dvojřetězcové zlomy DNA. Kontradiovala tak model navrhovaný Tang a spol. v roce 2006 [86]⁴⁸. Jediným pozorovaným rozdílem byla mírně se lišící bazální hladina proteinů MDM2 a p53 mezi některými klony. Tento rozdíl však nekoreloval s přítomností či absencí DAXX. Mohlo se tak jednat pouze o meziklonovou nespecifitu. Naše výsledky tedy ukazují, že adaptorový protein DAXX se nepodílí na regulaci proteinové stability transkripčního faktoru p53, což je v souladu s pozorováním Gostissa et al. [178]. Vedle nedekekovatelného vlivu DAXX na stabilitu p53 jsme nepotvrdili ani jeho vliv na transkripci genů regulovaných p53. Na rozdíl od Gostissa et al. jsme však měřili expresi vybraných genů přímo pomocí qPCR a nikoliv pomocí luciferázových reporterů obsahujících pouze fragment původního promotoru. Také jsme pro manipulaci hladiny proteinu DAXX použili několik přístupů (nadprodukcí proteinů, RNA interferenci a genovou delecí), abychom vyloučili případné nereprodukovatelné či náhodné výsledky.

Vedle nepřímé regulace nádorového supresoru p53 byl také popsán vliv adaptoru DAXX i na další transkripční faktory, jako např. SMAD4 nebo NF- κ B (RelA a RelB). V navazujících

⁴⁸ v obou případech se jedná o stejnou vědeckou skupinu.

experimentech jsme se proto zaměřili jednak na možný vliv fosforylace S564 na transkripční aktivitu těchto dvou faktorů a také na transkripci genů regulovanou multifunkčním proteinem BRCA1. Aktivita SMAD4 je kontrolována mj. SUMOylací a následnou vazbou adaptoru DAXX, kterou zprostředkovává C-koncová doména SIM [79]. SMAD4 zároveň reguluje několik genů v rámci DDR (např. *SNAI* nebo *ZEB*) [166], [167]. Rovněž aktivace signální dráhy NF- κ B po poškození DNA je prostudována velmi dobře. Vzájemná komunikace mezi několika klíčovými komponentami signální dráhy NF- κ B a DDR byla popsána na několika úrovních. Např. kináza ATM fosforyluje během genotoxického stresu NEMO/IKK γ [179] nebo RelA [180]. Mnohem více komplexnější je vztah mezi transkripčním faktorem p53 a NF- κ B [181], [182]. Rovněž regulace signální dráhy NF- κ B adaptorem DAXX byla popsána v několika studiích. DAXX je jednak negativním regulátorem RelB, kdy jeho vazba na promotor spolu s DNMT1 vede k metylaci promotoru a snížení transkripce genů jako např. *ATG8*, *cIAP1*. Tato transkripční represe, která je v nestresových podmínkách závislá na fosforylaci DAXX na aminokyselinách S737 a S739, však nebyla prostudována v rámci odpovědi na genotoxický stres a stejně tak ani není známá případná role fosforylace S564 v tomto procesu. U multifunkčního proteinu BRCA1 byla naše volba založena na nepřímých důkazech. Transkripční faktor BRCA1 hraje v DDR klíčovou úlohu, a to jak v homologní rekombinaci tak i v regulaci transkripce [183]. BRCA1 je však také součástí komplexu SWI/SNF (komplex remodelující chromatin). Naše laboratoř popsala také DAXX jako další součást komplexu SWI/SNF [168]. Ve stejné práci jsme také popsali další interakční partnery adaptoru DAXX: BAP1 a ABRAXAS. Ubikvinin-hydroláza BAP1 a stejně tak i ABRAXAS jsou přitom klíčovými interakčními partnery proteinu BRCA1. Ačkoliv doposud nebyla prokázána interakce nebo jiné funkční propojení mezi BRCA1 a DAXX, rozhodli jsme se na základě výše uvedených faktů zahrnout do naší studie také geny regulované proteinem BRCA1.

Celkově jsme vybrali 19 genů, jejichž exprese je řízena některým ze tří výše uvedených transkripčních faktorů (SMAD4, NF- κ B a BRCA1). Diferenciální expresní analýza mezi parentálními linií U2OS a linií U2OS *DAXX*^{-/-} ukázala, že z původních 19 genů se jich expresně lišilo osm, z toho 7 genů (*BCL2*, *cIAP1*, *cIAP2*, *IKBA*, *IL1a*, *TNFa* a *NOS*) mělo v U2OS *DAXX*^{-/-} hladinu mRNA sníženou, zatímco pouze jeden gen (*SNAI2*) zvýšenou. *SNAI2* je gen regulovaný transkripčním faktorem SMAD4 [166] a dle očekávání vedla genová delece DAXX (korepresoru SMAD4) ke zvýšení jeho exprese. Ze skupiny genů regulovaných BRCA1 byl pouze jeden (*NOS*) exprimován rozdílně. Vzhledem k nedostatečným informacím spojujícím DAXX a BRCA1 však není zřejmé, zda snížení exprese *NOS* v *DAXX*^{-/-} buňkách bylo přímým či nepřímým důsledkem absence exprese proteinu DAXX. Poslední sledovanou skupinou byly geny, jejichž exprese byla regulována transkripčním faktorem NF- κ B. U adaptoru DAXX bylo popsáno několik způsobů negativní regulace NF- κ B. DAXX skrze inhibici p300/CBP potlačuje acetylaci NF- κ B, což vede ke snížení jeho transkripční aktivity [165]. Reed at al. [125] popsali u myši linie MEF i nepřímou represi, kdy

komplex DAXX/DNMT1 metyluje promotory velké části genů včetně těch závislých na faktoru RelB z rodiny NF- κ B (*ATG8*, *TNFA*, *cIAP2*), což později potvrdil i Puto et al. [127]. My jsme však po genové deleci korepresoru DAXX nepozorovali zvýšení exprese, ale naopak její signifikantní snížení (např. *TNFA*, *cIAP1+2*, *BCL2*) popř. delece neměla na expresi žádný vliv (srov. *ATG8*, *IKBA*). Pro tento rozpor může existovat několik vysvětlení. Prvním důvodem by mohla být tkáňová specifita. V publikovaných studiích používali autoři myši linii MEF popř. lidské nádorové buňky PC3, zatímco my jsme pracovali s osteosarkomovou linií U2OS. Velmi důležitým faktem je také absence funkční ATPázy ATRX v linii U2OS [140]. Právě ATRX byl v posledních letech potvrzen jako klíčový (viz podkapitola 2.3.3 a Obrázek 12) pro řadu funkcí adaptoru DAXX spjatou s regulací transkripce. Genová delece DAXX na pozadí absence ATRX tak může mít kvalitativně jiný efekt. Dalším podstatným rozdílem je způsob manipulace s hladinou DAXX v buňkách. RNA interference použitá v publikovaných studiích je oproti genové deleci jednak krátkodobá (řádově dny) a jednak vede pouze k snížení hladiny. Transkripce v přítomnosti reziduálního proteinu se tak může lišit od transkripce v úplné a dlouhodobé (řádově týdny) absenci studovaného proteinu. Tento fenomén byl popsán již několikrát v minulosti. Např. časné práce studující DNMT1 v lidských buňkách využívaly RNA interferenci. Jak se ukázalo později, výsledky z těchto studií byly právě kvůli hypomorfnímu snížení DNMT1 arteficielní [184].

U genů s rozdílnou expresí na pozadí *DAXX*^{-/-} jsme následně chtěli ověřit, že je tato změna v transkripci přímým důsledkem absence adaptoru DAXX. Do linie U2OS *DAXX*^{-/-} jsme vrátili *DAXX*^{WT} na hladinu porovnatelnou s původní fyziologickou úrovní. Překvapivě, reintrodukce *DAXX*^{WT} popř. *DAXX*^{S564A} nevedla k navrácení transkripce těchto genů zpět na původní hladinu. Z tohoto důvodu bylo bezpředmětné porovnávat genovou expresi v závislosti na genotoxickém stresu. Příčinami tohoto negativního výsledku mohou být epigenetické kompenzace či změny transkripčního profilu v *DAXX*^{-/-} buňkách nekompatibilní s funkční reintrodukcí adapteru DAXX. Nesmíme však ale opominout otázku funkčnosti reintrodukováného proteinu DAXX. Vzhledem k tomu, že nemá enzymovou aktivitu (popř. spolehlivě ověřenou univerzální kotranskripční aktivitu), neexistuje v současné době žádný způsob ověření funkčnosti ektopického adaptoru DAXX.

Ačkoliv jsme však nemohli prokázat žádnou spojitost mezi změnou transkripce v rámci DDR a DAXX popř. jeho fosforylací, odhalily naše výsledky důležitou a doposud nepopsanou úlohu adaptoru DAXX v transkripci: dlouhodobá absence DAXX zřejmě vede k nezvratné změně transkripce pravděpodobně na epigenetické úrovni. A právě klíčové epigenetické mechanismy, jako je metylace DNA nebo (de)acetylace histonů, byly v několika studiích funkčně propojeny s adaptorem DAXX. Pro jednoznačné potvrzení vztahu mezi dlouhodobou absencí DAXX a změnou vzorce v metylaci DNA popř. acetylaci histonů je potřeba podrobnější studium epigenetické regulace např. pomocí bisulfátového sekvenování nebo chromatinové precipitace.

7 Závěry

- Adaptorový protein DAXX je fosforylován po dvojřetězcových zlomech DNA kinázou ATM na aminokyselině serin 564. Tato fosforylace je negativně regulována fosfatázou WIP1.
- Naše reproducidbilně získaná data jednoznačně vyvrátila dlouholetý model, dle kterého DAXX (včetně fosforylace S564) hraje klíčovou roli při stabilizaci transkripčního faktoru p53 během buněčné odpovědi na genotoxický stres.
- Genová delece adaptoru DAXX vede k změně (zejména snížení) exprese genů. Tato změna je ireverzibilní, neboť rekonstituce fyziologické exprese adaptoru DAXX na původní fyziologickou hladinu nevede k zpětné úpravě exprese.

8 Použitá literatura

1. Matsuoka, S., et al., *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage*. Science, 2007. **316**(5828): p. 1160-6.
2. Kouranti, I. and A. Peyroche, *Protein degradation in DNA damage response*. Semin Cell Dev Biol, 2012. **23**(5): p. 538-45.
3. Yurchenko, V., Z. Xue, and M.J. Sadofsky, *SUMO modification of human XRCC4 regulates its localization and function in DNA double-strand break repair*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(5): p. 1786-94.
4. Parker, J.L., et al., *SUMO modification of PCNA is controlled by DNA*. EMBO J, 2008. **27**(18): p. 2422-31.
5. Dou, H., et al., *Regulation of DNA repair through deSUMOylation and SUMOylation of replication protein A complex*. Mol Cell, 2010. **39**(3): p. 333-45.
6. Breslin, C., et al., *The XRCC1 phosphate-binding pocket binds poly (ADP-ribose) and is required for XRCC1 function*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(14): p. 6934-44.
7. Jia, P., C. Her, and W. Chai, *DNA excision repair at telomeres*. DNA Repair (Amst), 2015. **36**: p. 137-45.
8. Spivak, G., *Nucleotide excision repair in humans*. DNA Repair (Amst), 2015. **36**: p. 13-8.
9. Vaisman, A. and R. Woodgate, *Redundancy in ribonucleotide excision repair: Competition, compensation, and cooperation*. DNA Repair (Amst), 2015. **29**: p. 74-82.
10. Tham, K.C., R. Kanaar, and J.H. Lebbink, *Mismatch repair and homeologous recombination*. DNA Repair (Amst), 2016. **38**: p. 75-83.
11. Nam, E.A. and D. Cortez, *ATR signalling: more than meeting at the fork*. Biochem J, 2011. **436**(3): p. 527-36.
12. Walden, H. and A.J. Deans, *The Fanconi anemia DNA repair pathway: structural and functional insights into a complex disorder*. Annu Rev Biophys, 2014. **43**: p. 257-78.
13. Chen, F., et al., *Disruption of DNA-PK in Ku80 mutant xrs-6 and the implications in DNA double-strand break repair*. Mutat Res, 1996. **362**(1): p. 9-19.
14. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
15. Stiff, T., et al., *ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2390-6.
16. Ahnesorg, P., P. Smith, and S.P. Jackson, *XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining*. Cell, 2006. **124**(2): p. 301-13.
17. Bartocci, C. and E.L. Denchi, *Put a RING on it: regulation and inhibition of RNF8 and RNF168 RING finger E3 ligases at DNA damage sites*. Front Genet, 2013. **4**: p. 128.
18. Prakash, R., et al., *Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(4): p. a016600.
19. Koç, A., et al., *Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools*. J Biol Chem, 2004. **279**(1): p. 223-30.
20. Rajagopalan, P.T., et al., *Interaction of dihydrofolate reductase with methotrexate: ensemble and single-molecule kinetics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13481-6.
21. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 330-8.
22. Pommier, Y., et al., *DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs*. Chem Biol, 2010. **17**(5): p. 421-33.
23. Kennedy, D.R., et al., *Single chemical modifications of the C-1027 enediyne core, a radiomimetic antitumor drug, affect both drug potency and the role of ataxia-telangiectasia mutated in cellular responses to DNA double-strand breaks*. Cancer Res, 2007. **67**(2): p. 773-81.

24. Chen, J., et al., *Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(11): p. 3781-90.
25. Balagurumoorthy, P., S.J. Adelstein, and A.I. Kassis, *Novel method for quantifying radiation-induced single-strand-break yields in plasmid DNA highlights 10-fold discrepancy*. Anal Biochem, 2011. **417**(2): p. 242-6.
26. Sutherland, B.M., et al., *Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks*. Biochemistry, 2000. **39**(27): p. 8026-31.
27. Dahm-Daphi, J., C. Sass, and W. Alberti, *Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells*. Int J Radiat Biol, 2000. **76**(1): p. 67-75.
28. Ismail, I.H., et al., *Activation of ataxia telangiectasia mutated by DNA strand break-inducing agents correlates closely with the number of DNA double strand breaks*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4649-55.
29. Paull, T.T., et al., *A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage*. Curr Biol, 2000. **10**(15): p. 886-95.
30. Savitsky, K., et al., *A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1749-53.
31. Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. Nature, 2003. **421**(6922): p. 499-506.
32. Kozlov, S.V., et al., *Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation*. EMBO J, 2006. **25**(15): p. 3504-14.
33. Sun, Y., et al., *A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13182-7.
34. Nakada, D., K. Matsumoto, and K. Sugimoto, *ATM-related Tell associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism*. Genes Dev, 2003. **17**(16): p. 1957-62.
35. Falck, J., J. Coates, and S.P. Jackson, *Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 605-11.
36. Ziv, Y., et al., *Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(8): p. 870-6.
37. Metcalfe, J.A., et al., *Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia*. Nat Genet, 1996. **13**(3): p. 350-3.
38. McKerlie, M., S. Lin, and X.D. Zhu, *ATM regulates proteasome-dependent subnuclear localization of TRF1, which is important for telomere maintenance*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(9): p. 3975-89.
39. Tong, A.S., et al., *ATM and ATR Signaling Regulate the Recruitment of Human Telomerase to Telomeres*. Cell Rep, 2015. **13**(8): p. 1633-46.
40. Donehower, L.A., *Genetic instability in animal tumorigenesis models*. Cancer Surv, 1997. **29**: p. 329-52.
41. Royds, J.A. and B. Iacopetta, *p53 and disease: when the guardian angel fails*. Cell Death Differ, 2006. **13**(6): p. 1017-26.
42. Honda, R., H. Tanaka, and H. Yasuda, *Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53*. FEBS Lett, 1997. **420**(1): p. 25-7.
43. Honda, R. and H. Yasuda, *Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase*. Oncogene, 2000. **19**(11): p. 1473-6.
44. Li, M., et al., *Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization*. Nature, 2002. **416**(6881): p. 648-53.
45. Fang, S., et al., *Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 8945-51.
46. Harris, S.L. and A.J. Levine, *The p53 pathway: positive and negative feedback loops*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2899-908.

47. Kruse, J.P. and W. Gu, *SnapShot: p53 posttranslational modifications*. Cell, 2008. **133**(5): p. 930-30.e1.
48. Gu, B. and W.G. Zhu, *Surf the post-translational modification network of p53 regulation*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(5): p. 672-84.
49. Gartel, A.L. and S.K. Radhakrishnan, *Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences*. Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 3980-5.
50. Xiong, Y., H. Zhang, and D. Beach, *D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA*. Cell, 1992. **71**(3): p. 505-14.
51. Zhao, L., et al., *Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(3): p. 195-206.
52. Hermeking, H., et al., *14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression*. Mol Cell, 1997. **1**(1): p. 3-11.
53. Chan, T.A., et al., *14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage*. Nature, 1999. **401**(6753): p. 616-20.
54. Ohki, R., et al., *Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 22627-30.
55. Kastan, M.B., et al., *A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia*. Cell, 1992. **71**(4): p. 587-97.
56. He, L., et al., *A microRNA component of the p53 tumour suppressor network*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1130-4.
57. Kumamoto, K., et al., *Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence*. Cancer Res, 2008. **68**(9): p. 3193-203.
58. Menendez, D., A. Inga, and M.A. Resnick, *The expanding universe of p53 targets*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(10): p. 724-37.
59. Liu, G. and X. Chen, *The ferredoxin reductase gene is regulated by the p53 family and sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis*. Oncogene, 2002. **21**(47): p. 7195-204.
60. Wolff, S., et al., *p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity*. Cell Res, 2008. **18**(7): p. 733-44.
61. Fujita, K., et al., *Positive feedback between p53 and TRF2 during telomere-damage signalling and cellular senescence*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(12): p. 1205-12.
62. Fiscella, M., et al., *Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6048-53.
63. Kamp, W.M., P.Y. Wang, and P.M. Hwang, *TP53 mutation, mitochondria and cancer*. Curr Opin Genet Dev, 2016. **38**: p. 16-22.
64. Tang, J., et al., *p53-mediated autophagic regulation: A prospective strategy for cancer therapy*. Cancer Lett, 2015. **363**(2): p. 101-7.
65. Won, K.Y., et al., *Regulatory role of p53 in cancer metabolism via SCO2 and TIGAR in human breast cancer*. Hum Pathol, 2012. **43**(2): p. 221-8.
66. Dai, Q., et al., *Two p53-related metabolic regulators, TIGAR and SCO2, contribute to oroxylin A-mediated glucose metabolism in human hepatoma HepG2 cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(7): p. 1468-78.
67. Budanov, A.V., *The role of tumor suppressor p53 in the antioxidant defense and metabolism*. Subcell Biochem, 2014. **85**: p. 337-58.
68. Li, T., et al., *Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence*. Cell, 2012. **149**(6): p. 1269-83.
69. Pluta, A.F., W.C. Earnshaw, and I.G. Goldberg, *Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with HDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death*. J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 14): p. 2029-41.

70. Yang, X., et al., *Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis*. Cell, 1997. **89**(7): p. 1067-76.
71. Michaelson, J.S., et al., *Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development*. Genes Dev, 1999. **13**(15): p. 1918-23.
72. Wethkamp, N., et al., *Daxx-beta and Daxx-gamma, two novel splice variants of the transcriptional co-repressor Daxx*. J Biol Chem, 2011. **286**(22): p. 19576-88.
73. Ishov, A.M., et al., *PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1*. J Cell Biol, 1999. **147**(2): p. 221-34.
74. Goddard, A.D., et al., *Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia*. Science, 1991. **254**(5036): p. 1371-4.
75. Sternsdorf, T., et al., *Two nuclear dot-associated proteins, PML and Sp100, are often co-autoimmunogenic in patients with primary biliary cirrhosis*. Scand J Immunol, 1995. **42**(2): p. 257-68.
76. Elsässer, S.J., et al., *DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition*. Nature, 2012. **491**(7425): p. 560-5.
77. Liu, C.P., et al., *Structure of the variant histone H3.3-H4 heterodimer in complex with its chaperone DAXX*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(12): p. 1287-92.
78. DeNizio, J.E., S.J. Elsässer, and B.E. Black, *DAXX co-folds with H3.3/H4 using high local stability conferred by the H3.3 variant recognition residues*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(7): p. 4318-31.
79. Chang, C.C., et al., *Daxx mediates the small ubiquitin-like modifier-dependent transcriptional repression of Smad4*. J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 10164-73.
80. Kuo, H.Y., et al., *SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(47): p. 16973-8.
81. Lin, D.Y., et al., *Role of SUMO-interacting motif in Daxx SUMO modification, subnuclear localization, and repression of sumoylated transcription factors*. Mol Cell, 2006. **24**(3): p. 341-54.
82. Hwang, J. and R.F. Kalejta, *Human cytomegalovirus protein pp71 induces Daxx SUMOylation*. J Virol, 2009. **83**(13): p. 6591-8.
83. Ecsedy, J.A., J.S. Michaelson, and P. Leder, *Homeodomain-interacting protein kinase 1 modulates Daxx localization, phosphorylation, and transcriptional activity*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(3): p. 950-60.
84. Michod, D., et al., *Calcium-dependent dephosphorylation of the histone chaperone DAXX regulates H3.3 loading and transcription upon neuronal activation*. Neuron, 2012. **74**(1): p. 122-35.
85. Kubbutat, M.H., S.N. Jones, and K.H. Vousden, *Regulation of p53 stability by Mdm2*. Nature, 1997. **387**(6630): p. 299-303.
86. Tang, J., et al., *Critical role for Daxx in regulating Mdm2*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(8): p. 855-62.
87. Steck, P.A., et al., *Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers*. Nat Genet, 1997. **15**(4): p. 356-62.
88. Di Cristofano, A. and P.P. Pandolfi, *The multiple roles of PTEN in tumor suppression*. Cell, 2000. **100**(4): p. 387-90.
89. Li, J., et al., *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer*. Science, 1997. **275**(5308): p. 1943-7.
90. Stambolic, V., et al., *Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN*. Cell, 1998. **95**(1): p. 29-39.
91. Puc, J., et al., *Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability*. Cancer Cell, 2005. **7**(2): p. 193-204.

92. Trotman, L.C., et al., *Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 523-7.
93. Shen, W.H., et al., *Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity*. Cell, 2007. **128**(1): p. 157-70.
94. Song, M.S., et al., *The deubiquitylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 813-7.
95. Gibbons, R.J., et al., *Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome)*. Cell, 1995. **80**(6): p. 837-45.
96. Gibbons, R.J., D.J. Picketts, and D.R. Higgs, *Syndromal mental retardation due to mutations in a regulator of gene expression*. Hum Mol Genet, 1995. **4 Spec No**: p. 1705-9.
97. Baumann, C., M.M. Viveiros, and R. De La Fuente, *Loss of maternal ATRX results in centromere instability and aneuploidy in the mammalian oocyte and pre-implantation embryo*. PLoS Genet, 2010. **6**(9): p. e1001137.
98. Ritchie, K., et al., *Loss of ATRX leads to chromosome cohesion and congression defects*. J Cell Biol, 2008. **180**(2): p. 315-24.
99. Wong, L.H., et al., *ATRX interacts with H3.3 in maintaining telomere structural integrity in pluripotent embryonic stem cells*. Genome Res, 2010. **20**(3): p. 351-60.
100. Xue, Y., et al., *The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10635-40.
101. Tang, J., et al., *A novel transcription regulatory complex containing death domain-associated protein and the ATR-X syndrome protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(19): p. 20369-77.
102. Ishov, A.M., O.V. Vladimirova, and G.G. Maul, *Heterochromatin and ND10 are cell-cycle regulated and phosphorylation-dependent alternate nuclear sites of the transcription repressor Daxx and SWI/SNF protein ATRX*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 17): p. 3807-20.
103. Luciani, J.J., et al., *PML nuclear bodies are highly organised DNA-protein structures with a function in heterochromatin remodelling at the G2 phase*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 12): p. 2518-31.
104. Azzalin, C.M., et al., *Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends*. Science, 2007. **318**(5851): p. 798-801.
105. Goldberg, A.D., et al., *Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions*. Cell, 2010. **140**(5): p. 678-91.
106. O'Sullivan, R.J. and G. Almouzni, *Assembly of telomeric chromatin to create ALTERNATIVE endings*. Trends Cell Biol, 2014. **24**(11): p. 675-85.
107. Costanzi, C. and J.R. Pehrson, *Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 599-601.
108. Wutz, A., *X inactivation: a histone protects from reprogramming by the frog*. EMBO J, 2011. **30**(12): p. 2310-1.
109. Greaves, I.K., et al., *H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 525-30.
110. Meneghini, M.D., M. Wu, and H.D. Madhani, *Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin*. Cell, 2003. **112**(5): p. 725-36.
111. Earnshaw, W.C., *Discovering centromere proteins: from cold white hands to the A, B, C of CENPs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015. **16**(7): p. 443-9.
112. Wu, R.S., S. Tsai, and W.M. Bonner, *Patterns of histone variant synthesis can distinguish G0 from G1 cells*. Cell, 1982. **31**(2 Pt 1): p. 367-74.
113. Tagami, H., et al., *Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis*. Cell, 2004. **116**(1): p. 51-61.
114. Galvani, A., et al., *In vivo study of the nucleosome assembly functions of ASF1 histone chaperones in human cells*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(11): p. 3672-85.

115. Drané, P., et al., *The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3*. *Genes Dev*, 2010. **24**(12): p. 1253-65.
116. Delbarre, E., et al., *DAXX-dependent supply of soluble (H3.3-H4) dimers to PML bodies pending deposition into chromatin*. *Genome Res*, 2013. **23**(3): p. 440-51.
117. Nakamura, T., et al., *Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with beta-catenin, GSK-3beta and APC and reduces the beta-catenin level*. *Genes Cells*, 1998. **3**(6): p. 395-403.
118. Peters, J.M., et al., *Casein kinase I transduces Wnt signals*. *Nature*, 1999. **401**(6751): p. 345-50.
119. Rui, Y., et al., *Axin stimulates p53 functions by activation of HIPK2 kinase through multimeric complex formation*. *EMBO J*, 2004. **23**(23): p. 4583-94.
120. D'Orazi, G., et al., *Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(1): p. 11-9.
121. Li, Q., et al., *Daxx cooperates with the Axin/HIPK2/p53 complex to induce cell death*. *Cancer Res*, 2007. **67**(1): p. 66-74.
122. Hofmann, T.G., et al., *HIPK2 regulates transforming growth factor-beta-induced c-Jun NH(2)-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells*. *Cancer Res*, 2003. **63**(23): p. 8271-7.
123. Yao, Z., et al., *Death domain-associated protein 6 (Daxx) selectively represses IL-6 transcription through histone deacetylase 1 (HDAC1)-mediated histone deacetylation in macrophages*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(13): p. 9372-9.
124. Croxton, R., et al., *Daxx represses expression of a subset of antiapoptotic genes regulated by nuclear factor-kappaB*. *Cancer Res*, 2006. **66**(18): p. 9026-35.
125. Puto, L.A. and J.C. Reed, *Daxx represses RelB target promoters via DNA methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation*. *Genes Dev*, 2008. **22**(8): p. 998-1010.
126. Chang, C.C., et al., *Structural and functional roles of Daxx SIM phosphorylation in SUMO paralog-selective binding and apoptosis modulation*. *Mol Cell*, 2011. **42**(1): p. 62-74.
127. Puto, L.A., C. Benner, and T. Hunter, *The DAXX co-repressor is directly recruited to active regulatory elements genome-wide to regulate autophagy programs in a model of human prostate cancer*. *Oncoscience*, 2015. **2**(4): p. 362-72.
128. Puto, L.A., J. Brognard, and T. Hunter, *Transcriptional Repressor DAXX Promotes Prostate Cancer Tumorigenicity via Suppression of Autophagy*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(25): p. 15406-20.
129. Halder, U.C., et al., *Phosphorylation drives an apoptotic protein to activate antiapoptotic genes: paradigm of influenza A matrix 1 protein function*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(20): p. 14554-68.
130. Wan, Y.P., et al., *Transcriptional repression of hDaxx enhanced by adenovirus 12 E1B 55-kDa oncoprotein interacting with hDaxx*. *Chin Med J (Engl)*, 2004. **117**(5): p. 753-7.
131. Sieber, T. and T. Dobner, *Adenovirus type 5 early region 1B 156R protein promotes cell transformation independently of repression of p53-stimulated transcription*. *J Virol*, 2007. **81**(1): p. 95-105.
132. Schreiner, S., et al., *Proteasome-dependent degradation of Daxx by the viral E1B-55K protein in human adenovirus-infected cells*. *J Virol*, 2010. **84**(14): p. 7029-38.
133. Wimmer, P., et al., *Cross-talk between phosphorylation and SUMOylation regulates transforming activities of an adenoviral oncoprotein*. *Oncogene*, 2013. **32**(13): p. 1626-37.
134. Schreiner, S., et al., *Control of human adenovirus type 5 gene expression by cellular Daxx/ATRAX chromatin-associated complexes*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(6): p. 3532-50.
135. Berscheminski, J., et al., *Sp100 isoform-specific regulation of human adenovirus 5 gene expression*. *J Virol*, 2014. **88**(11): p. 6076-92.
136. Tang, Q. and G.G. Maul, *Mouse cytomegalovirus immediate-early protein 1 binds with host cell repressors to relieve suppressive effects on viral transcription and replication during lytic infection*. *J Virol*, 2003. **77**(2): p. 1357-67.

137. Saffert, R.T. and R.F. Kalejta, *Inactivating a cellular intrinsic immune defense mediated by Daxx is the mechanism through which the human cytomegalovirus pp71 protein stimulates viral immediate-early gene expression.* J Virol, 2006. **80**(8): p. 3863-71.
138. Cantrell, S.R. and W.A. Bresnahan, *Human cytomegalovirus (HCMV) UL82 gene product (pp71) relieves hDaxx-mediated repression of HCMV replication.* J Virol, 2006. **80**(12): p. 6188-91.
139. Hwang, J. and R.F. Kalejta, *Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of Daxx by the viral pp71 protein in human cytomegalovirus-infected cells.* Virology, 2007. **367**(2): p. 334-8.
140. McFarlane, S. and C.M. Preston, *Human cytomegalovirus immediate early gene expression in the osteosarcoma line U2OS is repressed by the cell protein ATRX.* Virus Res, 2011. **157**(1): p. 47-53.
141. Newhart, A., et al., *Single cell analysis of RNA-mediated histone H3.3 recruitment to a cytomegalovirus promoter-regulated transcription site.* J Biol Chem, 2013. **288**(27): p. 19882-99.
142. Winkler, L.L. and R.F. Kalejta, *The 19S proteasome activator promotes human cytomegalovirus immediate early gene expression through proteolytic and nonproteolytic mechanisms.* J Virol, 2014. **88**(20): p. 11782-90.
143. Greger, J.G., et al., *The cellular protein daxx interacts with avian sarcoma virus integrase and viral DNA to repress viral transcription.* J Virol, 2005. **79**(8): p. 4610-8.
144. Poleshko, A., et al., *Identification of cellular proteins that maintain retroviral epigenetic silencing: evidence for an antiviral response.* J Virol, 2008. **82**(5): p. 2313-23.
145. Huang, L., et al., *Daxx interacts with HIV-1 integrase and inhibits lentiviral gene expression.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **373**(2): p. 241-5.
146. Shalginskikh, N., et al., *Retroviral DNA methylation and epigenetic repression are mediated by the antiviral host protein Daxx.* J Virol, 2013. **87**(4): p. 2137-50.
147. Jiao, Y., et al., *DAXX/ATR, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors.* Science, 2011. **331**(6021): p. 1199-203.
148. Heaphy, C.M., et al., *Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations.* Science, 2011. **333**(6041): p. 425.
149. Yachida, S., et al., *Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors.* Am J Surg Pathol, 2012. **36**(2): p. 173-84.
150. de Wilde, R.F., et al., *Loss of ATRX or DAXX expression and concomitant acquisition of the alternative lengthening of telomeres phenotype are late events in a small subset of MEN-1 syndrome pancreatic neuroendocrine tumors.* Mod Pathol, 2012. **25**(7): p. 1033-9.
151. Marinoni, I., et al., *Loss of DAXX and ATRX are associated with chromosome instability and reduced survival of patients with pancreatic neuroendocrine tumors.* Gastroenterology, 2014. **146**(2): p. 453-60.e5.
152. Schwartzenuber, J., et al., *Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma.* Nature, 2012. **482**(7384): p. 226-31.
153. Lee, J.C., et al., *Alternative lengthening of telomeres and loss of ATRX are frequent events in pleomorphic and dedifferentiated liposarcomas.* Mod Pathol, 2015. **28**(8): p. 1064-73.
154. Macûrek, L., et al., *Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition.* Oncogene, 2010. **29**(15): p. 2281-91.
155. Ahn, J.Y., et al., *Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation.* Cancer Res, 2000. **60**(21): p. 5934-6.
156. Yamaguchi, H., et al., *The Wip1 phosphatase PPM1D dephosphorylates SQ/TQ motifs in checkpoint substrates phosphorylated by PI3K-like kinases.* Biochemistry, 2007. **46**(44): p. 12594-603.

157. Kleiblova, P., et al., *Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint*. J Cell Biol, 2013. **201**(4): p. 511-21.
158. Ryo, A., et al., *A suppressive role of the prolyl isomerase Pin1 in cellular apoptosis mediated by the death-associated protein Daxx*. J Biol Chem, 2007. **282**(50): p. 36671-81.
159. Kitagawa, D., et al., *Release of RASSF1C from the nucleus by Daxx degradation links DNA damage and SAPK/JNK activation*. EMBO J, 2006. **25**(14): p. 3286-97.
160. Tang, J., et al., *Phosphorylation of Daxx by ATM contributes to DNA damage-induced p53 activation*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55813.
161. Janssen, A. and R.H. Medema, *Genetic instability: tipping the balance*. Oncogene, 2013. **32**(38): p. 4459-70.
162. Nelson-Rees, W.A., et al., *Characteristics of HeLa strains: permanent vs. variable features*. Cytogenet Cell Genet, 1980. **27**(4): p. 216-31.
163. McCool, K.W. and S. Miyamoto, *DNA damage-dependent NF- κ B activation: NEMO turns nuclear signaling inside out*. Immunol Rev, 2012. **246**(1): p. 311-26.
164. Poltz, R. and M. Naumann, *Dynamics of p53 and NF- κ B regulation in response to DNA damage and identification of target proteins suitable for therapeutic intervention*. BMC Syst Biol, 2012. **6**: p. 125.
165. Park, J., et al., *Inhibition of NF-kappaB acetylation and its transcriptional activity by Daxx*. J Mol Biol, 2007. **368**(2): p. 388-97.
166. Levy, L. and C.S. Hill, *Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF-{beta}) target genes and distinguishes TGF-{beta}-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(18): p. 8108-25.
167. Takano, S., et al., *Smad4 is essential for down-regulation of E-cadherin induced by TGF-beta in pancreatic cancer cell line PANC-1*. J Biochem, 2007. **141**(3): p. 345-51.
168. Svadlenka, J., et al., *Multifunctional adaptor protein Daxx interacts with chromatin-remodelling ATPase Brg1*. Biochemistry and Biophysics Reports, 2016. **5**: p. 246-252.
169. Bochar, D.A., et al., *BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer*. Cell, 2000. **102**(2): p. 257-65.
170. Harte, M.T., et al., *BRD7, a subunit of SWI/SNF complexes, binds directly to BRCA1 and regulates BRCA1-dependent transcription*. Cancer Res, 2010. **70**(6): p. 2538-47.
171. Jenkins, L.M., et al., *p53 N-terminal phosphorylation: a defining layer of complex regulation*. Carcinogenesis, 2012. **33**(8): p. 1441-9.
172. Mercurio, F., et al., *IkappaB kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(2): p. 1526-38.
173. Carr, A., *The patient with shoulder problems*. Practitioner, 1997. **241**(1572): p. 158-60.
174. Lucey, B.P., W.A. Nelson-Rees, and G.M. Hutchins, *Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination*. Arch Pathol Lab Med, 2009. **133**(9): p. 1463-7.
175. MacLeod, R.A., et al., *Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source*. Int J Cancer, 1999. **83**(4): p. 555-63.
176. Song, J.J. and Y.J. Lee, *Tryptophan 621 and serine 667 residues of Daxx regulate its nuclear export during glucose deprivation*. J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30573-8.
177. Kitamura, T., et al., *Mutant p53 disrupts the stress MAPK activation circuit induced by ASK1-dependent stabilization of Daxx*. Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7681-8.
178. Gostissa, M., et al., *The transcriptional repressor hDaxx potentiates p53-dependent apoptosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48013-23.
179. Huang, T.T., et al., *Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress*. Cell, 2003. **115**(5): p. 565-76.
180. Fang, L., et al., *ATM regulates NF- κ B-dependent immediate-early genes via RelA Ser 276 phosphorylation coupled to CDK9 promoter recruitment*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(13): p. 8416-32.

181. Schneider, G., et al., *Cross talk between stimulated NF-kappaB and the tumor suppressor p53*. *Oncogene*, 2010. **29**(19): p. 2795-806.
182. Hoesel, B. and J.A. Schmid, *The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer*. *Mol Cancer*, 2013. **12**: p. 86.
183. Gorski, J.J., et al., *Profiling of the BRCA1 transcriptome through microarray and ChIP-chip analysis*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(22): p. 9536-48.
184. Brown, K.D. and K.D. Robertson, *DNMT1 knockout delivers a strong blow to genome stability and cell viability*. *Nat Genet*, 2007. **39**(3): p. 289-90.